

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Peter Bartenstein

Generierung *muriner* monoklonaler Antikörper  
und gentechnische Herstellung spezifischer F<sub>ab</sub>-Fragmente gegen  
die tumorassoziierte Isoform 1  
des *humanen* Tenascin C  
für die Radioimmuntherapie von Gliomen

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Univ. Erika Wagner

aus  
Klein Kopisch

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. med. Peter Bartenstein
Mitberichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. med. Claus Belka
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. medic. Franz-Josef Gildehaus
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	21.12.2010



Meiner Familie

# Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Glioblastom und Therapieformen	2
1.2	Radioimmuntherapie von Gliomen	5
1.3	Tenascin	9
1.3.1	Tenascin Isoformen	9
1.3.2	Tenascin C	11
1.3.3	Tenascin C als tumorassoziiertes Antigen	12
1.4	Struktur und physiologische Funktion der Immunglobuline	14
1.4.1	Struktur und Funktion von Antikörpern	14
1.4.2	Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper in vitro	17
1.4.3	Gentechnische Verfahren zur Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente	19
1.5	Projektbeschreibung und Zielsetzung	21
2	Methoden	23
2.1	Molekularbiologische Methoden	23
2.1.1	RNA-Extraktion aus humanen Gliom-Biopsaten	23
2.1.2	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	23
2.1.3	Reverse Transkription und cDNA-Synthese	24
2.1.4	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	24
2.1.5	5'-RACE- Polymerase Ketten Reaktion (5'-RACE-PCR)	25
2.1.6	Elektrophoretische Auftrennung der DNA und RNA	27
2.1.7	Reinigung und DNA-Isolierung	28
2.1.7.1	Reinigung von DNA-Fragmenten nach einer PCR	28
2.1.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli - mittels Silicasäulen	28
2.1.7.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli - Ammoniumacetatfällung	28
2.1.8	Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Plasmide	29
2.1.8.1	„Blunt end“- Klonierung in den pET151-Vektor	29
2.1.8.2	TA-Klonierung in den pCR2.1-Vektor	30
2.1.8.3	Gerichtete Klonierung in den pASK85-D1.3-Vektor	30

2.1.8.4 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA.....	30
2.1.8.5 Ligation von „sticky-end“ DNA-Fragmenten.....	31
2.1.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	31
<b>2.2 Gentechnische Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	31
2.2.2 Herstellung chemikompetenter E. coli JM83-Zellen.....	32
2.2.3 Transformation und Selektion chemikompetenter E. coli TOP10-, BL21(DE3)- und JM83-Zellen.....	32
2.2.4 Heterologe IPTG-induzierte Expression rekombinanter His6-tagged Polypeptide in E. coli.....	33
2.2.5 Heterologe Tetracyclin-induzierte Expression rekombinanter His6- tagged Polypeptide in E. coli.....	34
<b>2.3 Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>35</b>
2.3.1 Säulen-Chromatographische Reinigung des Antigens mittels IMAC.....	35
2.3.2 Säulen-Chromatographische Reinigung der Fab-Fragmente mittels IMAC.....	36
2.3.3 Affinitätschromatographische Protein A/G Reinigung der mAk....	37
2.3.4 Dialyse und Konzentration proteinhaltiger Lösungen.....	38
2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	38
2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese - SDS-PAGE.....	39
2.3.6.1 Coomassie Färbung.....	39
2.3.6.2 Silber-Färbung nach dem SDS-PAGE.....	39
2.3.7 N-terminale Proteinsequenzierung.....	40
<b>2.4 Immunchemische Methoden.....</b>	<b>41</b>
2.4.1 Bestimmung des Antikörpertiters mittels ELISA.....	41
2.4.2 Indirekter ELISA zur Selektion von Hybridoma Klonen.....	42
2.4.3 Indirekter ELISA zur Bestimmung der Antigen Bindekapazität von mAk's und Fab-Fragmenten.....	43
2.4.4 Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper.....	43
2.4.5 Immunfluoreszenznachweis von Antikörpern an Hybridoma.....	44
2.4.6 Immundetektion am Western Blot.....	44
2.4.7 Immunhistochemie - Histologie.....	46
2.4.7.1 Silanisierung von Objektträgern.....	46
2.4.7.2 Gewebefixierung und Einbettung nach der Cryo-(Gefrier-) Methode.....	46

2.4.7.3 Herstellung von Schnitten nach der Gefrierfixierung.....	47
2.4.8 Immunhistochemische Färbung von Cryoschnitten nach der LSAB-Methode.....	47
2.4.8.1 Gewebefixierung und Einbettung nach der HOPE-Methode....	48
2.4.8.2 Herstellung von Schnitten nach der HOPE-Fixierung.....	50
2.4.8.3 Entparaffinierung und Rehydrierung HOPE-fixierter Schnitte.....	50
2.4.8.4 IHC-Färbung von HOPE-Schnitten nach der LSAB-Methode.	51
2.4.8.5 Auswertung der immunhistochemischen Präparate.....	51
<b>2.5 Zellkultur eukaryontischer Zelllinien.....</b>	<b>51</b>
2.5.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen und Techniken.....	51
2.5.2 Zellkulturmedien.....	51
2.5.3 Bestimmung der Zellzahl.....	53
2.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	53
2.5.5 Mycoplasmentest und DAPI-Färbung.....	54
2.5.6 Kultur der Myelomazellen P3X63Ag.653.....	54
2.5.7 Gewinnung der Milz-Zellen der immunisierten Mäuse.....	54
2.5.8 Immortalisierung der B-Zellen.....	55
2.5.9 HAT-Selektion.....	56
2.5.10 Limiting-Dilution-Klonierung der Hybridoma.....	57
<b>2.6 Tierexperimentelle Methoden.....</b>	<b>57</b>
2.6.1 Immunisierung von Balb/c Mäusen.....	57
2.6.1.1 Haltung der Balb/c Mäuse.....	57
2.6.1.2 Immunisierung.....	58
2.6.1.3 Serumgewinnung aus Maus-Blut.....	58
2.6.2 Pharmakokinetik der mAk und Fab-Fragmente.....	59
2.6.2.1 Tiermodell und Tierhaltung.....	59
2.6.2.2 Tumormodell.....	60
2.6.2.3 Tierhaltung, Anästhesie, Abbruchkriterien und Euthanasie.....	60
2.6.2.4 Studien zur Biodistribution Radionuklid-markierter Antikörper und Antikörperfragmente.....	61
2.6.2.5 Szintigraphie.....	61
2.6.2.6 Radioiodmarkierung der Antikörper.....	62
2.6.2.7 Indium-DTPA-Konjugation der Immunglobulin Ketten.....	62
2.6.2.8 Bedingungen für die Dünnschichtchromatographie.....	63

3 Ergebnisse	65
<b>3.1 Rekombinante Antigen-Herstellung in E. coli</b>	<b>65</b>
3.1.1 Sequenzanalysen und Nachweis der tumorassoziierten Isoform des humanen Tenascin C	65
3.1.2 Auswahl und Nachweis eines geeigneten Antigens für die Herstellung mAk gegen das hTNC-1	69
3.1.3 Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors für die rekombinante Herstellung des Antigens	73
3.1.4 Heterologe Expression des His6-tagged-hTNC-1(P1257-V1420) in E. coli BL21 (DE3)	75
<b>3.2 Generierung muriner monoklonaler Antikörper</b>	<b>78</b>
3.2.1 Immunisierung von Mäusen mit His6-tagged-hTNC-1(P1257-V1420)	78
3.2.2 Immortalisierung muriner B-Zellen und Selektion dieser mittels indirektem ELISA	79
3.2.3 Adaptation an serumfreies Medium und Bioreaktor	81
<b>3.3 Affinitätschromatographische Protein A Reinigung der monoklonalen Antikörper</b>	<b>82</b>
<b>3.4 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper in vitro</b>	<b>84</b>
3.4.1 Isotypisierung der monoklonalen Antikörper	84
3.4.2 Charakterisierung der mAk mittels Western Blot	84
3.4.3 Immunhistochemische Charakterisierung der Antikörper	86
3.4.4 Bestimmung der Antigenerkennung des mAk WGGD4-B4 gegen His6-tagged-hTNC-1(P1257-V1420)	91
<b>3.5 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper in vivo</b>	<b>92</b>
3.5.1 Kopplung des Radionuklides [123I]Iod an den Antikörper	92
3.5.2 Biodistribution und Biokinetik der [123I]Iod konjugierter mAk	93
3.5.3 Biodistribution und Biokinetik des [111In]Indium-DTPA konjugierten mAk WGGD4-B4	99
3.5.4 Biodistribution und Biokinetik des [111In]Indium-DTPA-konjugierten mAk BC-24	104
<b>3.6 Gentechnische Herstellung hTNC-1 spezifischer Fab-Fragmente</b>	<b>108</b>
3.6.1 Konstruktion des Expressionsvektors pASK85-B4	108
3.6.1.1 N-terminale Proteinsequenzierung der VH- und VL-Ketten	108
3.6.1.2 Selektive Amplifikation der VL- und VH-Ketten mit degenerierten Primern	109



3.6.1.3 RT-PCR zur Amplifikation der VL- und VH-Ketten mit degenerierten/Inosin-Primern.....	110
3.6.1.4 5'-RACE-PCR zur Amplifikation der VH- und VL-Ketten.....	111
3.6.1.5 Sequenz- und Datenbankanalysen der VH- und VL-Regionen.....	113
3.6.2 Rekombinante Herstellung des hTNC-1 spezifischen Fab-Fragmentes B4.....	115
3.6.2.1 Heterologe Expression des rekombinanten Fab-Fragmentes B4 in E. coli JM83 und affinitätschromatographische Aufreinigung mittels IMAC.....	118
3.6.3 Charakterisierung des hTNC-1 spezifischen Fab-Fragmentes Fab-B4 in vitro.....	120
3.6.3.1 Bestimmung der Antigenerkennung des Fab-Fragmentes B4 gegen His-tagged-hTNC-1(P1257-V1428).....	120
3.6.3.2 Charakterisierung des Fab-Fragmentes B4 mittels Western Blot.....	121
3.6.4 Charakterisierung des hTNC-1 spezifischen Fab-Fragmentes Fab-B4 in vivo.....	122
3.6.4.1 Kopplung des Radionuklides [111In]Indium an das Fab-B4. .	122
3.6.5 Biodistribution und Biokinetik des [111In]Indium-konjugierten Fab-B4.....	122
 4 Diskussion	 127
 5 Zusammenfassung	 137
 6 Materialien	 139
 7 Abkürzungen	 155
 8 Literatur	 160
 9 Lebenslauf	 175



# 1 Einleitung

Die Inzidenz der weltweiten Krebserkrankungen liegt bei Gehirntumoren, die ihren Ursprung aus Zellen des ZNS haben, bei 2% (Landis *et al.*, 1999). Mit dieser Diagnose beginnt für die meisten Betroffenen ein schwerer Leidensweg, der in kürzester Zeit meist tödlich endet. Gewebewucherungen, die sich aus dem Nervenstützgewebe, den Hirnhäuten oder der Hirnanhangsdrüse entwickeln, werden als primäre Gehirntumore bezeichnet. Sie beeinträchtigen durch die cerebrale Raumforderung, die sie verursachen, das Hirn in seiner Funktion. Primäre maligne Tumore wachsen meist rasch und neigen dazu umliegendes gesundes Hirngewebe diffus zu infiltrieren (Black, 1991a; Black, 1991b). Eine vollständige operative Entfernung von malignen Gehirntumoren kann nicht erreicht werden, so dass sich die mittlere Überlebenszeit für Betroffene kaum bessert (Black, 1998; Black, 2000; Devaux *et al.*, 1993). Ebenso kann mit üblichen Therapieformen, wie der Chemotherapie oder der Strahlentherapie, die Krankheit nicht geheilt werden. Die mittlere Überlebenszeit kann lediglich verlängert werden. Der limitierende Faktor für den Erfolg dieser Therapieformen ist die Schonung des umliegenden gesunden Hirngewebes (Burnet und Taylor, 1997).

Weltweit wird stetig versucht, bestehende und neue Therapieformen, die sich in der klinischen Erprobungsphase befinden, weiter zu verbessern und neue Wirkstoffe zur Bekämpfung primärer Gehirntumore zu entwickeln.

Einen neuen, viel versprechenden Ansatz für die Therapie maligner Gliome stellt die systemische oder lokale Applikation radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper bzw. Antikörper-Fragmente dar (Carter, 2001; Neri und Bicknell, 2005). Die Antikörper sind hierbei gegen tumorspezifische Oberflächenmoleküle gerichtet (Hazra *et al.*, 1995) und werden mit einem Radionuklid konjugiert. Der Antikörper adressiert im Idealfall das Radionuklid nur an die Tumorzelle, wobei die radioaktive Strahlung die Tumorzelle zerstört. Antikörper bieten für die Radioimmuntherapie (RIT) den Vorteil einer mittleren Plasmahalbwertszeit von ca. zwei Wochen. Ein geeigneter Antikörper, gekennzeichnet durch eine hohe Affinität (Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen einer Ag-Bindungsstelle auf dem Antikörper und einem Epitop auf dem Antigen) und Avidität (Maß für die Stärke, mit der ein bivalenter Antikörper an ein intaktes Antigen bindet) gegenüber dem Tumorantigen, verweilt darüber hinaus mindestens 72 h am Tumor und kann dadurch den „Crossfire-Effekt“ des Strahlers verlängern (Sharkey und Goldenberg, 2005). Die bisher durchgeführten klinischen Studien der systemischen und der lokoregionalen Radioimmuntherapie maligner Gehirntumore sind in Kombination mit den konventionellen Therapieformen erfolgversprechend (Brauckmann, 2006).

Die Differentialdiagnostik von primären Gehirntumoren erfolgt mittels bildgebender MRT-Verfahren und funktioneller nuklearmedizinischer Verfahren. Anhand der hiermit festgestellten Tumorcharakteristika wird über mögliche Therapieformen entschieden. Ein maximaler Erfolg der Therapieform für die Behandlung von Gliomen, im Speziellen für den der RIT, kann durch die Verwendung gentechnisch hergestellter radiomarkierter Antikörper-Fragmente in der funktionellen nuklearmedizinischen Bildgebung erzielt werden (Renner *et al.*, 2001). Der Erfolg der RIT hängt stark von der Expressionshöhe des Tumorantigens ab, gegen den der Antikörper gerichtet ist. Diese Antikörper-Fragmente sind für das gleiche Tumorantigen wie der später in der Therapie verwendete Antikörper spezifisch. Patienten bei denen in der funktionalen Bildgebung solch eine erhöhte Expression nachweisbar ist, sprechen besser auf die anschließende RIT an.

## 1.1 Glioblastom und Therapieformen

Die häufigsten Hirntumore bei Erwachsenen stellen mit ca. 52% die primären Gehirntumore (Gliome) dar (Comprehensive Cancer Center Tübingen, 2006).

Gliome entstehen aus Gliazellen, den Stützzellen des Gehirns. Histomorphologisch kann die Art der Stützzelle, aus der der Tumor hervorgegangen ist, bei den meisten Gliomen festgestellt werden. Astrozytome entstehen aus Astrozyten und stellen die häufigste Art der neoplastischen Erkrankungen des ZNS dar (Rao, 2003). Die Ependynome, sowie die Oligodendrogliome gehen aus Ependymzellen bzw. Oligodendrozyten hervor. Darüber hinaus gibt es Tumor-Mischformen, die aus verschiedenen Arten von Stützzellen entstehen (z.B. Oligo-Astrozytom: Oligodendrozyten und Astrozyten). Insgesamt werden über 200 Tumorentitäten von der Welt-gesundheitsorganisation (WHO) unterschieden. Die Klassifikation der Gliome nach histologischen Merkmalen wird 1925 von Bailey und Cushing eingeführt (Bailey & Cushing, 1925). Heutzutage wird zur Klassifikation das histologische Graduierungssystem der World Health Organisation (WHO) (Louis *et al.*, 2007) verwendet. Wichtige Informationen für die Klassifizierung eines Tumors liefern auch dessen immunhistochemische und molekulargenetische Eigenheiten (Kim, 2000). Demnach werden vier Malignitätsgrade unterschieden: WHO°I bis WHO°IV.

Niedergradige Gliome, wie das pilozytische Astrozytom (WHO°I), werden als benigne eingestuft. Diese Tumoren zeichnen sich durch ein niedriges Proliferationspotential aus. Sie wachsen nicht infiltrativ und die Heilungschancen nach operativer Entfernung des Tumors sind sehr gut. Das diffuse Astrozytom (WHO°II) gilt schon als maligne Form der Gliome. Diese Tumoren wachsen zwar ebenfalls langsam, aber infiltrativ und neigen sehr stark zu einer postoperativen Rezidivbildung. Anaplastische Astrozytome (WHO°III) haben ein erhöhtes Proliferationspotential, wachsen invasiv und zeigen

Merkmale der Anaplasie. Die Rezidivierung erfolgt innerhalb weniger Jahre, wodurch die Überlebenszeit etwa 2-3 Jahre beträgt. Eine der aggressivsten Gliomarten ist neben dem anaplastischen Astrozytom, das Glioblastoma multiforme (GBM/WHO°IV). GBM ist mit einer Inzidenz von 12-15% aller primärer Gehirntumore der häufigste Hirntumor (Meyer et al., 2007; Leins *et al.*, 2003). Ein WHO°III oder IV Tumor ist demnach vor allem durch ein schnelles diffuses Wachstum, Anaplasie und seine genetische Veränderungen gekennzeichnet und geht mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher. Das Glioblastoma multiforme erfüllt alle zuvor genannten Merkmale (Grad I-III) und unterscheidet sich unter anderem von einem anaplastischen Astrozytom durch das Vorhandensein von Nekrosen, verstärkter vaskulärer Proliferation und mehreren genetischen Veränderungen (chromosomale Aberrationen, Mutationen).

Die Standardtherapie nach erfolgter Differentialdiagnostik maligner Gliome, die eine cerebrale Raumforderung verursachen, ist die möglichst vollständige operative Entfernung (OP) dieser Tumore. Bei kleinen Tumoren und nach erfolgter Resektion der größeren Gliome wird die Standardtherapie chemotherapeutisch und/oder mittels Bestrahlung weiter geführt. Die mittlere Überlebenszeit an malignen Gliomen (WHO°IV) erkrankten Patienten beträgt mit Standardtherapie (OP, Bestrahlung, Chemotherapie) weniger als ein Jahr (Maldaun *et al.*, 2004).

In der Behandlung derartiger Tumore hat sich auch die Möglichkeit der Therapie mit Antikörpern bewährt (Paganelli *et al.*, 2001; Zalutsky *et al.*, 2002; Goetz *et al.*, 2003). Dabei wird die für Antikörper charakteristische Eigenschaft genutzt, ein bestimmtes Antigen, hier tumorassoziiertes Antigen (TAA), an der Zelloberfläche von Tumoren zu erkennen und nur hier spezifisch zu binden. Koppelt man nun ein Cytostatikum an diesen Antikörper, so soll idealerweise der Wirkstoff zielgerichtet nur die maligne entartete Zellen treffen. Man erreicht durch die Anwendung spezifischer, gegen TAA gerichteter Antikörper in jedem Fall eine geringere Schädigung des umliegenden gesunden Gewebes, verglichen mit den anderen konventionellen Therapieentitäten, und kann so die Konzentration des Wirkstoffes an der Tumorzelle deutlich erhöhen.

Ein Problem bei der Behandlung von Gehirntumoren sind Resttumorzellen, die am Rande des Tumors gesundes Hirngewebe infiltrieren und operativ nicht entfernt werden können. Ein Antikörper kann aufgrund seiner Größe nicht weit in das Gewebe diffundieren. Antikörperfragmente, wie F(ab)<sub>2</sub>-, Fab- oder scFv-Fragmente, di-, tri- und multivalente-Fragmente, die ein geringeres Molekulargewicht im Vergleich zu Antikörpern haben, könnten hierfür eine Lösung darstellen (Carter *et al.*, 1997; Cortez-Retamozo *et al.*, 2002). Die rekombinante Herstellung von Antikörpern und Antikörper-Fragmenten gewinnt mehr und mehr an Relevanz für die Behandlung solider Tumoren (Gura, 2001; Storto *et al.*, 2001; Souriau und Hudson, 2003).

Die Radioimmuntherapie (RIT) von malignen Gliomen wird weltweit in klinischen Studien erprobt (Westphal, 1998; Gregor und Cull 1996; Zalutsky, 2005; Paganelli *et al.*, 2006). An die verschiedenen Antikörpermoleküle wird ein radioaktives Isotop (Radionuklid) gekoppelt. Die Reichweite der zytotoxischen Strahlung beträgt bis zu 4 mm (Abb. 1.1). Durch geeignete Radionuklidwahl können Tumorzellen über eine Distanz von mehreren Zelldurchmessern adressiert und abgetötet werden (Prinzip der Anwendung von Beta-Strahler in der RIT). Dadurch werden auch, weiter von der Tumorzelle entfernte, Antigen negative Tumorzellen und Tumorzellen in sogenannten „kalten Zonen“ erfasst (Zalutsky & Bigner, 1996).

Die schlechte Penetration der Antikörper in das Gewebe wird durch den „Kreuzfeuereffekt“ mit  $\beta$ -Strahlern größerer Reichweite, wie dem  $[^{90}\text{Y}]$ Yttrium, zumindest teilweise ausgeglichen (Wheldon, 2000; Donoghue *et al.*, 1995; Zweit, 1996).

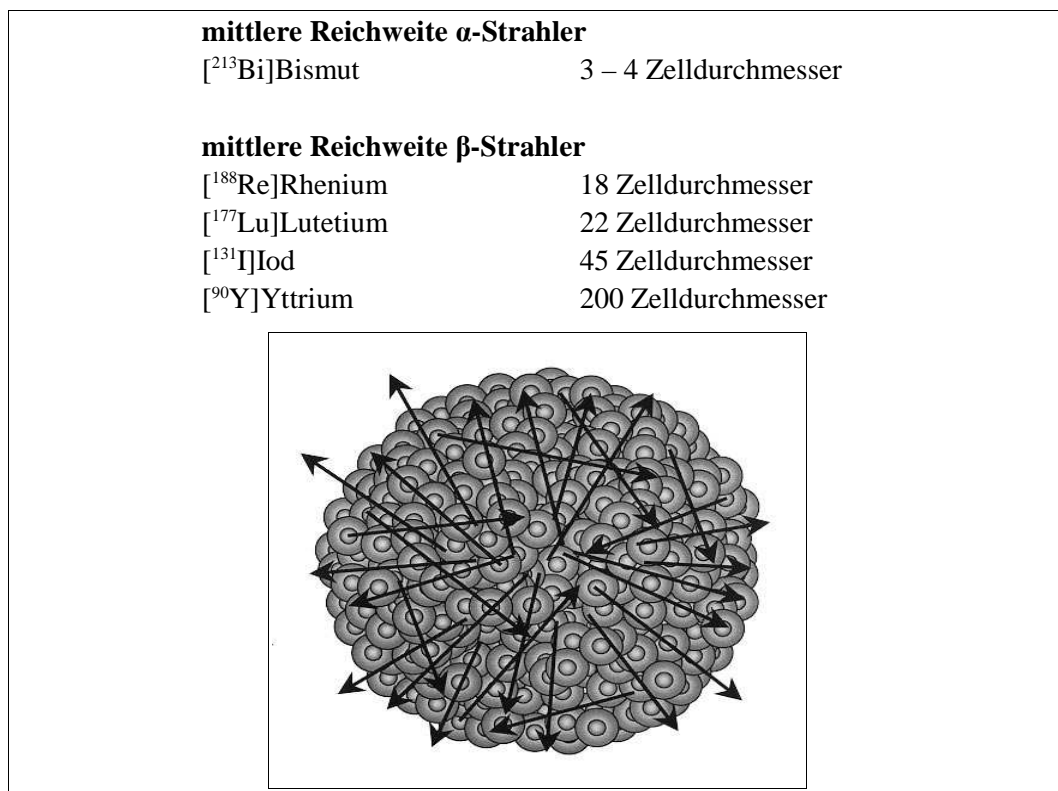


Abbildung 1.1: Anwendung von Strahlern in der RIT: direkte Wirkung von  $\alpha$ -Strahlern auf Tumorzellen (Tortora *et al.*, 2007) und Zerstörung von Tumorzellen durch den „Kreuzfeuereffekt“ energiereicher  $\beta$ -Strahler; mittlerer Tumorzelldurchmesser  $\sim 20 \mu\text{m}$ . (Bild aus: Wheldon, 2000)

## 1.2 Radioimmuntherapie von Gliomen

Die Radioimmuntherapie (RIT) unterscheidet sich von der konventionellen externen oder lokalen Bestrahlung dadurch, dass sie systemisch und zielgerichtet erfolgt (siehe Abb. 1.2). Es wird entweder ein monoklonaler Antikörper (mAk), der direkt radioaktiv markiert ist, oder ein Avidin-Biotin-konjugierter mAk, der erst am Tumor mit dem Radionuklid konjugiert wird („pretargeted RIT“) eingesetzt. Durch die selektive Bindung des Antikörpers an bestimmte Oberflächenmoleküle des Glioms wird eine hohe lokale Konzentration des Radionuklids am Tumor erreicht (Westphal, 1998; Gregor und Cull 1996; Zalutsky, 2005; Paganelli *et al.*, 2006).

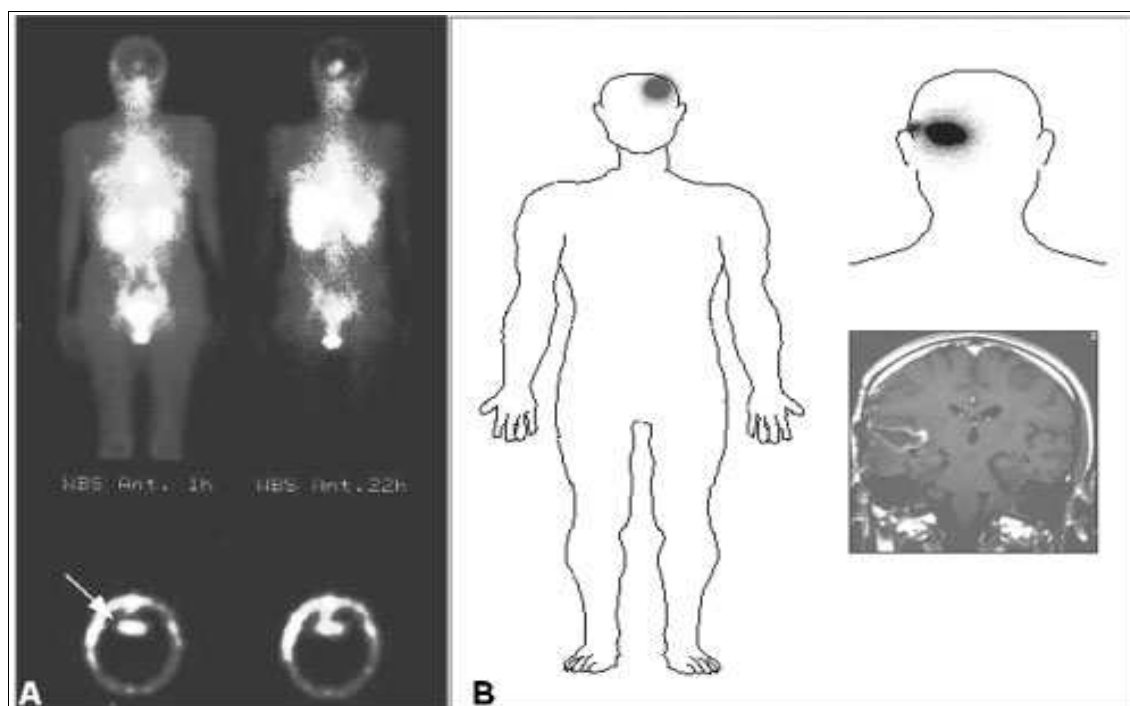


Abbildung 1.2: Radioimmuntherapie des Glioms: Koronare Schnittbilder, rekonstruiert aus der Verteilung der Radioaktivität nach A: systemische Administration ; B: lokoregionale Gabe des mAk-Nuklid-Konjugates (aus Paganelli *et al.*, 2006)

Kombiniert mit den gängigen Therapieentitäten, ist die RIT eine viel versprechende Therapieform für Gliom-Patienten (Pöpperl *et al.*, 2006). Die Weiterentwicklung der RIT, durch Optimierung der unterschiedlichen Applikationsformen, Verbesserung der biologischen Trägermoleküle (Immunglobuline) und Erforschung neuer besserer Zielmoleküle am Tumor, wird weltweit verfolgt. Ebenso wird die Markierung oder

Konjugation der Antikörpermoleküle mit verschiedenen radioaktiven Strahlern stetig weiterentwickelt.

Bewährt hat sich in vielen weltweit durchgeführten klinischen Studien die systemische oder lokoregionale Applikation eines Radionuklid-konjugierten Antikörpers (Riva *et al.*, 2000; Pöpperl *et al.*, 2002; Huynh *et al.*, 2006). Die mittlere Überlebenszeit radioimmuntherapierter Patienten mit GBM beträgt dabei 12 - 24 Monate, bei guter Verträglichkeit und einer deutlich erhöhten Lebensqualität. Im Vergleich dazu betrug die mittlere Überlebenszeit einer Patientengruppe, die nur die Standardtherapie (Operation und perkutane Radiatio) erhielten, lediglich 9,7 Monate (Pöpperl *et al.*, 2002).

Ein großer Vorteil der lokoregionalen RIT liegt in der Umgehung der Bluthirnschranke, der hohen lokalen Aktivitätskonzentration und der niedrigen systemischen Toxizität, die bei der systemischen Applikation auftreten kann.

In unserer Arbeitsgruppe wurde, in einer ersten Pilotstudie, die lokoregionale RIT nach erfolgter Standardtherapie, mit 1-5 RIT-Zyklen im Abstand von 6 Wochen mit durchschnittlich 1100 MBq [<sup>131</sup>I]Iod-markierten Antikörpern über ein Ommaya-Reservoir (kissenförmiger Kunststoff-Behälter) verabreicht (Pöpperl *et al.*, 2002). Das Ommaya-Reservoir wird, noch während der Resektion des Tumors, unter die Kopfhaut implantiert und endet, über einen Katheter, in der Tumorsektionshöhle. In dieses Reservoir wird der konjugierte Antikörper appliziert und gelangt dann in die Resektionshöhle. Therapiert werden mit dieser Methode Patienten mit malignen WHO°III und °IV Tumoren. Das Radioimmunkonjugat in der Tumorkhöhle bleibt über 5 Tage stabil. Die mittlere Überlebenszeit liegt zurzeit bei 18,5 Monaten (Abb. 1.3/rechts) und ist damit deutlich höher als bei einer historischen Patientengruppe mit Standardtherapie: 9,7 Monate und 89 Patienten (Abb. 1.3/links).



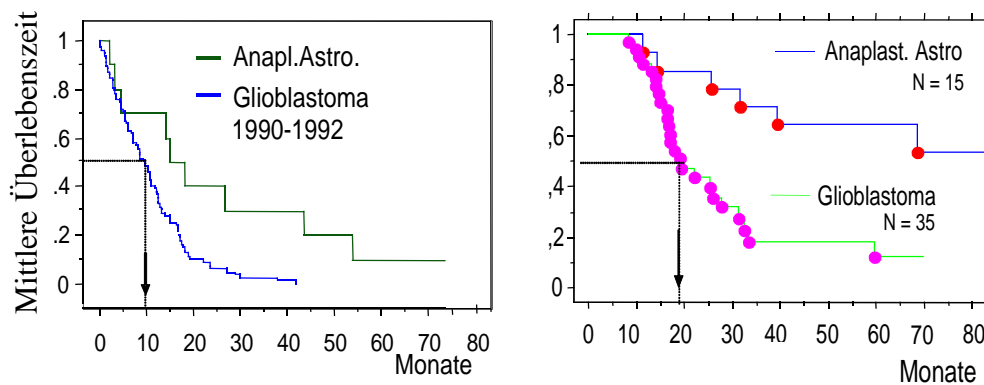


Abbildung 1.3: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: Links: Mittlere Überlebenszeit einer Patientengruppe mit Standardtherapie (OP und Bestrahlung); Rechts: mittlere Überlebenszeit von Patienten mit Standardtherapie gefolgt von RIT mit [ $^{131}\text{I}$ ]Iod markierten Antikörpern im Rahmen einer ersten Pilot-Studie (Pöpperl et al., 2002)

In einer zweiten klinischen Studie wird das mA-Konjugat nach einem fraktionierten Schema verabreicht (4 Zyklen zu 1850, 1480, 1100 und 740 MBq [ $^{131}\text{I}$ ]Iod-markierten Antikörpern). Die mittlere Überlebenszeit der hier eingeschlossenen Patienten, die an WHO°III-Astrozytomen oder GBM (WHO°IV) erkrankt sind, konnte auf 22 Monate gesteigert werden, bei geringen Nebenwirkungen (Abb. 1.4)

Eine dritte Studie wird mit [ $^{188}\text{Re}$ ]Rhenium markierten Antikörpern und in Anlehnung an die zweite Studie durchgeführt (Gildehaus, et al., 2007). Durch den höher energetischen  $\beta$ -Strahler [ $^{188}\text{Re}$ ]Rhenium wird die mittlere Reichweite im Gewebe erhöht. Eine Phase II Studie soll zeigen, ob mit Rhenium bessere Resultate für die RIT erreicht werden können.

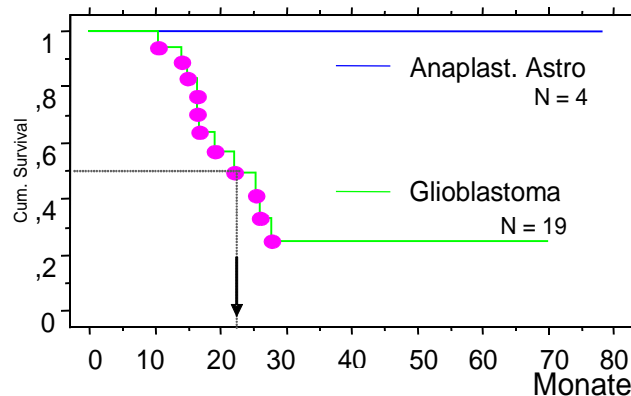


Abbildung 1.4: Kaplan-Meier-Überlebenskurve: mittlere Überlebenszeit von Patienten nach Standardtherapie gefolgt von RIT mit  $^{131}\text{I}$  markierten Antikörpern und Gabe nach dem fraktioniertem Schema (Gildehaus, et al., 2007)

Neben Applikationsart, der Frage der einmaligen bzw. der fraktionierten Gabe des Immunkonjugats und der Wahl des Radionuklids (abhängig von Größe und Durchblutung des Tumors) spielt auch die radiochemische Markierungsmethode eine entscheidende Rolle für den Erfolg der Therapie. Zur Markierung mit dem radioaktiven Isotop  $^{131}\text{I}$  Iod (Koordinierungsbedarf) werden Disulfidbrücken, die das Antikörpermolekül zusammenhalten, gespalten. Die Bindeeigenschaften des Antikörpers werden dadurch beeinflusst. So wird vermehrt versucht beispielsweise über peptidische Linker und Komplexbildner das Isotop nicht direkt an die Antikörperkette zu binden. Der Linker wird zuerst konjugiert (ein kleines Peptid verträgt weitaus harschere Markierungsbedingungen) und wird anschließend unter standardisierten nicht/oder wenig denaturierenden Bedingungen an den Antikörper gekoppelt.

Die wichtigsten biochemischen Determinanten für eine effektive Radioimmuntherapie sind: neben der Wahl des Radionuklids mit seiner Strahlenqualität und der Stabilität des Immunkonjugats nach der Markierung, eine homogenen Expression des Zielantigens im Tumorgewebe und die Affinität bzw. Avidität des Antikörpers gegenüber seinem Antigen.

Um die Nebenwirkungen der RIT so gering wie möglich zu halten, wird durch die Optimierung der Spezifität des Antikörpers ebenfalls eine Verbesserung der Therapie erzielt. Durch einen Antikörper, der mit Strukturen an benachbarten gesunden Hirngewebe kreuz reagiert, werden auch gesunde Hirnzellen adressiert. Dies führt erstens zu einem Verlust von Antikörper-Nuklid am Tumor, wodurch kein maximaler Erfolg der Therapie gewährleistet ist und zweitens zu vermehrter Zerstörung von gesunden Hirnarealen in der unmittelbaren Nachbarschaft der Tumorkhöhle. Des weiteren kann durch einen wenig aviden (Avidität definiert die Bindungsstärke des Antikörpers am Zielantigen) Antikörper eine schnelle Dissoziation und damit eine

verkürzte *in vivo* Halbwertszeit des Antikörpers ebenfalls negative Folgen für den Therapieerfolg haben.

Der zur Zeit eingesetzte Antikörper BC-24 bindet an das extrazelluläre Matrixprotein Tenascin C (*hTNC*). Das *hTNC* wird mit steigendem WHO Grad vermehrt in Gliomen exprimiert (Behrem *et al.*, 2005). *hTNC* gilt als sogenanntes tumorassoziiertes Antigen (TAA), das erstmals 1983 von Bourdon und Mitarbeitern (Bourdon *et al.*, 1983) beschrieben wurde. Das Distributionsverhalten des BC-24 und die durch Pepsinverdau erhaltenen F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente sind in unserer Arbeitsgruppe an einem C6-Ratten-Modell *in vivo* getestet worden (Götz *et al.*, 2005). Das genaue Epitop (als Teil des *hTNC*-Molekül) des monoklonalen *murinen* Antikörpers BC-24, der kommerziell bezogen wird, ist jedoch wenig charakterisiert. Ebenso fehlen *in vitro* Daten zur Kreuzreaktivität dieses Antikörpers. Die geringe Verfügbarkeit des BC-24 für die RIT und die Tatsache, dass der Antikörper als Aszitesfluid hergestellt wird (der aufwendig gereinigt werden muss), sind weitere Nachteile dieses Antikörpers.

Um einen vollständig charakterisierten monoklonalen Antikörper für die RIT zur Verfügung stehen zu haben, muss ein neuer vollständig charakterisierter monoklonaler Antikörper hergestellt werden. Das primäre Ziel hierbei ist die Entwicklung eines Antikörpers, ohne Kreuzreaktivität und einer höheren Avidität gegenüber dem *hTNC* als BC-24, mit dem Ziel die Nebenwirkungen der RIT zu minimieren und dadurch einen besseren Therapieerfolg zu erreichen.

Einige Nebenwirkungen der Therapie mit Antikörpern, wie die Bildung von HAMA oder auch die langsame Clearance, können durch die anschließende gentechnische Herstellung und Veränderung dieses Antikörpers verbessert werden. Die Humanisierung des Fc-Teils, die rekombinante Herstellung von Antikörper-Fragmenten und die Möglichkeit der gentechnischen Reifung (mittels Affinitätsmaturierung) zur Verbesserung der Affinität bzw. Avidität dieser Antikörper wären dann ebenso möglich und würden die Nebenwirkungen dieser Therapie weiter zu minimieren helfen.

## 1.3 Tenascin

### 1.3.1 Tenascin Isoformen

Zellen in einem Gewebeverband sind in der extrazellulären Matrix (ECM) eingebettet. Die ECM (*engl.*: extracellular matrix) ist in zwei Komponenten gegliedert, zum einen die amorphe Grundsubstanz, zum anderen die Fasern. Die amorphe Grundsubstanz, in welche die Zellen und Fasern eingebettet sind, setzt sich hauptsächlich aus interstitieller Flüssigkeit, Glykosaminoglykanen (GAGs), Proteoglykanen und Glykoproteinen zusammen. Diese Makromoleküle spielen eine Rolle bei der Wundheilung und der

Regulation des Wasserhaushaltes von Geweben. Die zellgebundenen Proteoglykane beeinflussen sowohl Adhäsion, als auch Migration der Zellen im ECM (Drenckhahn & Kugler 1994). Prozesse wie Lockerung der Zelle im Gewebeverband, und somit deren Fortbewegung (Migration), resultieren aus den Interaktionen solcher Proteine im ECM mit integralen Zellmembranrezeptoren (Alberts *et al.*, 2005). Darüber hinaus werden durch Adhäsionsmoleküle die Proliferation und die Zelldifferenzierung beeinflusst. Diese Prozesse spielen ebenso bei der Tumorgenese eine entscheidende Rolle.

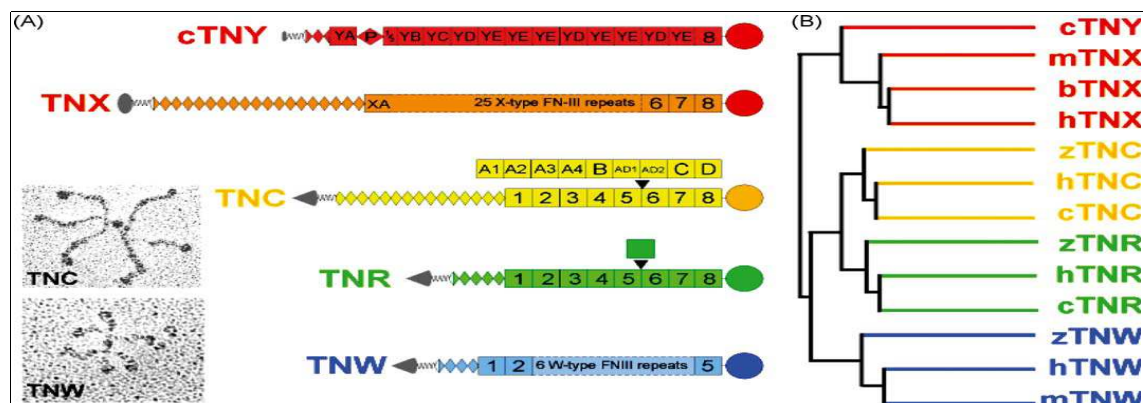


Abbildung 1.5: Struktur der Tenascin Isoformen: Tenascin-Y (cTNY) in Huhn und vier humane Tenascin-Isoformen: hTNX, hTNC, hTNR, hTNW. Gewellte Linie: „Heptad Repeats“, karo: EGF-like Repeats, Quadrat: Fibronektin type III Repeats, Kreis: globuläre Fibrinogen-Domäne. Fibronektin-type III Repeats werden alternativ gespleißt, wodurch weitere Spleißisoformen der hier abgebildeten Tenascine entstehen. Links: EM-Aufnahme eines hexameren humanen Tenascin C (hTNC) und -W (hTNW). (B) Sequenzanalysen der Fibrinogen Domänen zeigen höhere Homologien der Spleißisoformen aus unterschiedlichen Spezies im Vergleich zu den Gesamtsequenzen der Isoformen einer Spezies (c, chicken; m, mouse; b, bovine; h, human; z, zebra fish) (aus Chiquet-Ehrismann, 2004)

Ein wichtiger Vertreter der Adhäsionsmoleküle ist das Tenascin, welches Prozesse, wie Tumorgenese und Tumorzellmigration (Lockerung der Zelle im Gewebeverband), beeinflusst. Tenascin ist ein multifunktionales Glykoprotein, das in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird. Tenascin ist unter verschiedenen Synonymen bekannt. Zuerst wurde es, von Bourdon und Mitarbeitern „glioma mesenchymal extracellular matrix protein“ (GMEM) benannt (Bourdon *et al.*, 1983), dann wird es unter dem Namen „Myotendinous Antigen“ von Chiquet und Mitarbeitern beschrieben (Chiquet *et al.*, 1984). Sie wiesen mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers in Muskelsehnenverbindungen eine Komplexbildung zwischen dem Antikörper und einem unbekannten Protein nach (Chiquet *et al.*, 1984). Im Huhn wird das Protein als Cytotactin bezeichnet (Grumet *et al.*, 1985). Kruse und Mitarbeiter beschreiben 1985 ein Glykoprotein unter

dem Namen J1220/200-Glykoprotein, dem auf Adhäsionsvorgänge zwischen Neuronen und Gliazellen eine hemmende Funktion zugeschrieben wurde (Kruse *et al.*, 1985). Schließlich wurde es 1986 von Chiquet-Ehrismann *et al.*, als Tenascin bezeichnet. Dieser Name setzt sich aus den lateinischen Verben „tenere = halten“ und „nascere = geboren werden“ zusammen. „Nasci“ spielt auf die funktionelle Rolle während der Embryogenese an und „tenere“ weist auf die Expression im zugfesten Gewebe hin (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1986). Während der Embryogenese kommt Tenascin vorübergehend in Regionen mesenchymaler Kondensation vor, wie zum Beispiel in der Brustdrüse, der Zahnglocke der Niere (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1991), im Darm (Aufderheide *et al.*, 1987), in Knorpel und Knochen (Mackie *et al.*, 1987), sowie in dem zentralen und peripheren Nervensystem.

Tenascin C, Tenascin R (TNR), Tenascin X (TNX), Tenascin Y (TNY) und Tenascin W (TNW) sind gut beschriebene Vertreter der Tenascin Familie (Erickson, 1993). Tenascin R wird als neurales Zelladhäsionsmolekül des zentralen Nervensystems beschrieben und unter dem Namen J1160/180, Restrictin oder Janusin (Rathjen *et al.*, 1991; Fuss *et al.*, 1993) bekannt. TNX ist ein essentieller Bestandteil verschiedener Gewebe (Bristow *et al.*, 1993). TNY übt Einfluss auf das Zellwachstum aus (Hagios *et al.*, 1996). TNW wird von Weber *et al.* aus dem Zebrafisch isoliert, wo es während der Skelettbildung synthetisiert wird (Weber *et al.*, 1998).

### 1.3.2 Tenascin C

Das *hTNC* wurde als erstes im sich entwickelnden Zentralnervensystem im Menschen beschrieben (Laywell *et al.*, 1992).

Die Expression des *humanen* Tenascin C (*hTNC*) wird mit der zellulären Proliferation, Migration und der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix in Verbindung gebracht (Bronner-Fraser, 1988). Die *hTNC* Expression ist, außer in Arealen mit sekundärer Neurogenese und Zell-Migration, wie der lateralen subventrikulären Zone, im adulten Zustand vermindert (Miragall *et al.*, 1990; Gates *et al.*, 1995). Im adulten Gewebe ist *hTNC* im Gewebe glatter Muskelzellen (Grumet *et al.*, 1985), in der Haut (Lightner *et al.*, 1994), in Thymuszellen (Saga *et al.*, 1992), während der Wundheilung (Chuong & Chen, 1991) und, als Grundlage dieser Arbeit, während der Tumorentstehung (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1986) exprimiert.

Das *hTNC* ist das am besten charakterisierte Mitglied der Tenascin Familie. *hTNC* interagiert mit Integrinen, Kollagenen, Proteoglykanen und Fibronektin (Chung, 1995).

Es kann, abhängig von der zellulären Umgebung, entweder als Adhäsions- oder Antiadhäsions-Protein fungieren (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1988).

Das *hTNC* Monomer ist ein lineares Molekül. Das aminoternale Ende ist sehr cysteinereich und bildet intramolekulare Disulfidbrücken, die für die Bildung der hexameren Struktur verantwortlich sind (Abb. 1.5). Darauf folgt eine Sequenz von 14 EGF (epidermal growth factor)-like Domänen, an die sich, abhängig von der Splice-Variante, mehrere Fibronectin Typ III (FNIII) Domänen anschließen. Die Fibronectin-Domänen enthalten die RGD-Sequenz, die für die Zelladhäsion eine wichtige Rolle spielt (Pierschbacher *et al.*, 1984). Das Carboxyterminale Ende besteht aus einer einzigen Einheit, die homolog zur D-Region des Fibrinogen ist (Abb. 1.5).

Es werden 5 *humane* Tenascin C Isoformen (Abb. 1.5) in der Literatur beschrieben (Chiquet-Ehrismann, 2004). Sie entstehen durch alternatives Spleißen der neun FNIII-Domänen. Das Molekulargewicht der Spleißisoformen liegt zwischen 180-240 Kilodalton. Die schweren *hTNC* Isoformen (*hTNC*-1 und *hTNC*-4) werden Zeit limitiert, wie bereits erwähnt, während der Embryogenese exprimiert. Darüber hinaus kann es zu einer erneuten oder erstmaligen Expression in pathologisch veränderten Geweben, z.B. bei Neoplasien kommen (Dorries & Schachner, 1994; Tucker *et al.*, 1994). In etwa 80% aller Glioblastome (WHO°IV) wird die *hTNC*-Expression nachgewiesen, ohne jedoch zwischen den einzelnen Spleißisoformen unterscheiden zu können (Bonino *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2000). In gesunden Hirnarealen kann mit solchen Antikörpern *hTNC*-1 nicht nachgewiesen werden. Nicht-tumorassoziierte Isoformen des *humanen* TNC (*hTNC*-2, -3, - 5, -6) können in geringen Mengen in der weißen Substanz des telencephalischen Lappens (Großhirn) und in der ersten Schicht der grauen Substanz vorhanden sein. Im Schläfenlappen ist die *hTNC*-Expression erhöht und fehlt hier in der Nähe der Gefäße (Behrem *et al.*, 2005). Im Unterschied dazu steht die starke *hTNC*-Expression in der Nähe der Gefäße in hochgradig malignen Gliomen (Behrem *et al.*, 2005). Es handelt sich hierbei vermutlich um andere Spleißisoformen als im Normalhirn.

### 1.3.3 Tenascin C als tumorassoziiertes Antigen

Die Isoform 1 (*hTNC*-1) des *hTNC* wird in verschiedenen Entitäten maligner Tumore, wie den Gliomen, exprimiert (Koukoulis, *et al.*, 1991). Die genaue gewebe morphologische Lokalisation der Expression des *hTNC*-1 (ca. 240 kDa) in Gliomen ist noch nicht bekannt. Da in konditionierten Medien kultivierter *humaner* Gliom-Zelllinien eine große Menge an *hTNC*-1 vorhanden ist, spricht dafür, dass das *hTNC*-1 von den Gliomzellen selbst exprimiert wird (Bourdon *et al.*, 1983). Eine andere Überlegung führt jedoch zu der Annahme, dass *hTNC*-1 nicht von den Tumorzellen

selbst gebildet wird, sondern dass diese die *hTNC*-1-Synthese im Mesenchym induzieren (Anbazhagan *et al.*, 1990; Mackie *et al.*, 1987). Die Arbeitsgruppe um Zagzag stellte mittels immunhistochemischen Nachweis 1995 eine signifikant erhöhte *hTNC*-Konzentration in GBM und eine Korrelation der Expression mit dem Tumorgrad fest (Zagzag *et al.*, 1995). Dieses Ergebnis konnte, zum Beispiel, von Behrem und Mitarbeitern bestätigt werden (Behrem *et al.*, 2005). Die für einen histologischen Nachweis von *hTNC* vorhandenen Antikörper unterscheiden allerdings nicht zwischen den einzelnen Isoformen des *hTNC*. Zudem scheinen maligne Tumore, je nach Stadium, andere Isoformen des *hTNC* zu exprimieren. Das hat zur Folge, dass, je nachdem mit welchem Antikörper der Nachweis geführt wurde, *hTNC* entweder in der ECM der Krebszellen oder an mesenchymalen Strukturen, wie den Gefäßwänden, lokalisiert wurde (Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003). Für die Tumorgenese und Prognose ist es enorm wichtig einen Antikörper zu haben, der zwischen den einzelnen Isoformen unterscheiden kann, um genauer das Stadium eines Tumors diagnostizieren zu können. Die Wahl der richtigen Therapieform ist ebenso von einer guten Differentialdiagnostik abhängig wie die Optimierung des Therapieerfolgs (Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003). Es ist demnach enorm wichtig, eben solch einen Antikörper einzusetzen, der zwischen den Isoformen diskriminieren kann. Speziell im Falle von WHO°III und WHO°IV Gliomen sollte solch ein Antikörper nur die tumorassoziierte Isoform 1 (*hTNC*-1) spezifisch erkennen.

Bis heute ist nicht detailliert geklärt worden, wie sich die Interaktionen des *hTNC* mit anderen Adhäsionsmolekülen und den Integrinen auf die Signalgebung und somit auf das Verhalten der Tumorzellen auswirken (Vollmer, 1997). Es ist jedoch bekannt, dass, sowohl in der Zellkultur als auch im Mausmodell, eine erzwungene Interaktion zwischen Tumorzellen und Fibronektin (FN) die Tumor-Proliferation blockiert (Akamatsu *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass *hTNC* die Interaktion von FN mit den Zellen unterbricht und somit die Tumorzell-Proliferation potentiell fördert (Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1988; Chiquet-Ehrismann *et al.*, 1986).

Ein theoretisches Modell (Abb. 1.6) impliziert das Syndecan-4 als Corezeptor der Integrin-Signaltransduktion (Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003; Huang *et al.*, 2001). Die FN-Zell-Interaktion wird dadurch beeinträchtigt, dass *hTNC* kompetitiv an die Syndecan-4 Bindungsstelle und dem RGD-Sequenzmotiv, innerhalb des FN bindet. Derart kann *hTNC* wachstumsfördernde Signalwege beeinflussen – unter anderem die wnt- und MAPK-Signaltransduktionskaskade (Ruiz *et al.*, 2004). Damit ein Gewebe wächst, müssen sich teilende Zellen locker im Gewebeverband sitzen. Eine entsprechende Wirkungsweise des *hTNC* wird auch für das Tumorwachstum und der Tumorzellmetastasierung diskutiert.

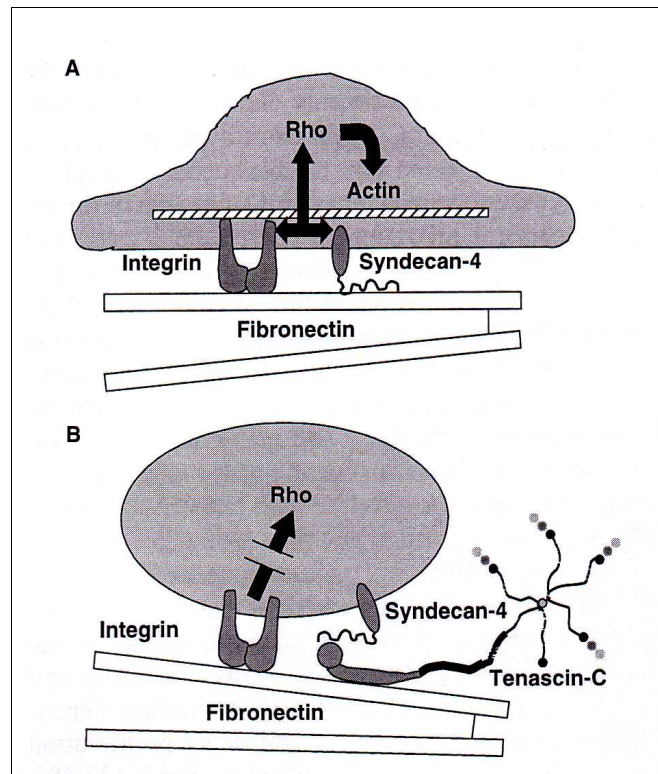


Abbildung 1.6: Das multimere humane Tenascin C in der ECM: Ein theoretisches Modell, für die Interaktion des hTNC in der ECM: A) Zelle in einem Gewebsverband: ist kein hTNC in der ECM vorhanden, liegt die Zelle gut verankert im Zellverband; B) hTNC löst die Interaktion zwischen Syndecan und Fibronectin, dieses Signal nimmt die Zelle über die Integrin-Rezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind, wahr und leitet Signaltransduktionskaskaden zum Zellkern ein. Diese wiederum haben zur Folge, dass das Zytoskelett umgebaut wird, bis hin zur Abkugelung und Migration der Zelle aus dem Zellverband (aus: Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003)

## 1.4 Struktur und physiologische Funktion der Immunglobuline

### 1.4.1 Struktur und Funktion von Antikörpern

Antikörper (auch als Immunglobuline bezeichnet) werden bereits nach dem ersten Kontakt des Organismus mit einem Antigen gebildet. Die Makrophagen des Blutes nehmen Krankheitserreger oder andere Fremdstoffe auf, um diese zu zerstören und präsentieren anschließend an ihrer Oberfläche Antigene dieses Erregers. In den lymphatischen Organen - wie der Milz - treffen diese Zellen auf unreife B-Zellen und regen diese zur Antikörperproduktion gegen das von ihnen präsentierte Antigen an. Es werden neben Gedächtniszellen auch Plasma-Zellen gebildet, die sich nicht mehr teilen können, das Immunsystem jedoch mit den von ihnen sezernierten Antikörpern



versorgen. Oft ist, wie bei den meisten Impfungen, ein wiederholter Kontakt der B-Zellen mit dem gleichen Antigen notwendig, damit das Immunsystem Gedächtniszellen anlegt und beim erneuten Kontakt mit dem Erreger schneller reagiert (Klein, 1991).

In das Blut sezernierte Antikörper gelangen aufgrund ihrer verhältnismäßig geringen Größe fast überall in alles Gewebe und haben die wichtige Aufgabe Erreger und Fremdstoffe für Killer- und Fresszellen des Immunsystems zu markieren. Viele Antigene werden ohne Antikörper gar nicht oder erst sehr spät von den Zellen des Immunsystems erkannt.

Das Immunsystem höher entwickelter Tiere ist in der Lage, gegen fast jedes präsentierte Antigen einen spezifischen Antikörper herzustellen. Die Vielfalt der möglichen Antikörper wird auf etwa  $10^{12}$  geschätzt und ist unter anderem auf die besondere Organisation ihrer Gene zurückzuführen (Nossal, 2003).

Der variable Teil der Immunglobulin-Gendomanen ist in Gensegmente unterteilt (V-, D-, J-Regionen), der sowohl während der Translation als auch während der Transkription rekombinieren kann:

Kombinatorische Diversität der Immunglobuline:

- Leichte Kette  $\lambda$ : 29 V-, 4 J-Segmente = 116 Möglichkeiten
- Leichte Kette  $\kappa$ : 40 V-, 5 J -Segmente = 200 Möglichkeiten
- Schwere Kette: 51 V-, 27 D-, 6 J-Segmente = 8262 Möglichkeiten

---


$$\Sigma = (116 + 200) \times 8262 = 2.6 \times 10^6 \text{ Möglichkeiten}$$

Zusätzlich wird die Variabilität, durch, während der Reifung von B-Zellen (wiederholter Kontakt mit dem Antigen) in diesen variablen Regionen auftretenden Zufallsmutationen (somatische Hypermutation) potenziert (geschätzt können so  $10^{12}$  verschiedene Antikörper generiert werden). Man spricht hier von Affinitätsreifung der B-Zellen bzw. des Antikörpers. Antikörper, die spezifisch das Antigen erkennen, werden konserviert (Gedächtniszellen des Immunsystems).

Der Aufbau der Immunglobuline lässt sich am besten anhand des Immunglobulins G (IgG), dem Antikörper (mAk) mit der höchsten Konzentration im Blut, beschreiben (Abb. 1.8). Ein IgG-Molekül besitzt eine Gesamtmasse von ca. 150 kDa. Porter zeigte, dass sich IgG nach kurzer proteolytischer Einwirkung des Enzyms Papain in drei Fragmente: zwei Antigen-bindende Fragmente (Fab = engl. fragment antigen-binding) und ein leicht kristallisierbares Fragment (Fc = engl. fragment crystalline) mit einem Gewicht von je 50 kDa spalten lässt (Porter, 1959).

Die beiden leichten Ketten (L-Kette) tragen zur Gesamtmasse je 25 kDa, die schweren Ketten (H-Kette) mit jeweils ca. 50 kDa bei. Die beiden Arme enden in den N-terminalen, variablen Domänen der H- und L-Ketten, über die die Antigen-Bindung erfolgt. Der Stamm wird aus den C-terminalen Enden der beiden H-Ketten gebildet, welche zusätzlich den Effektorbereich des Antikörpers enthalten. Die einzelnen Ketten lassen sich in Domänen einer Länge von 110 Aminosäuren (AS) unterteilen, wobei jede Domäne durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zusammen gehalten wird. Die L-Ketten besitzen zwei Domänen, die N-terminale variable Domäne ( $V_L$ ) und die C-terminale konstante Domäne ( $C_L$ ). Die H-Ketten bestehen aus vier oder fünf Domänen. Sie besitzen ebenfalls die variable N-terminale Domäne ( $V_H$ ), gefolgt von den konstanten Domänen  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ . Die Verbindung zwischen Stamm und Armen wird durch die Scharnierregion, die sogenannte HINGE-Region, eine kurze, bewegliche Polypeptidkette zwischen  $C_{H1}$  und  $C_{H2}$  gebildet, wodurch der Winkel zwischen den Fab-Fragmenten sehr flexibel ist. Dies begünstigt die Komplexbildung von Antigen und Antikörper.

Innerhalb der variablen Domänen zeigen sich große Sequenzunterschiede, die sich auf drei hypervariable Domänen, den complementary determining regions (CDRs), konzentrieren. Über die CDRs von H- und L-Kette erfolgt die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper (Tonegawa, 1985).

Es existieren verschiedene Isotypen der leichten und der schweren Kette. Die Isotypen der L-Kette sind funktionell äquivalent und bestehen entweder aus einer  $\lambda$ -, oder einer  $\kappa$ -Kette. Für die schwere Kette existieren die fünf Isotypen  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$ , und  $\epsilon$ . Diese determinieren die fünf Hauptklassen der Immunglobuline IgM, IgD, IgG, IgA und IgE in dieser Reihenfolge. Der Isotyp der schweren Kette bestimmt die Struktur und Funktion des Antikörpers. IgM kann als Monomer oder Pentamer, IgA als Monomer, Dimer oder Trimer vorliegen. Die restlichen drei Immunglobulinklassen liegen als Monomere vor.

Die B-Zellen können alle fünf Ig-Klassen exprimieren. Ist die B-Zellreifung abgeschlossen werden IgM und IgD-Moleküle membrangebunden exprimiert. Sie werden dann als B-Zell-Rezeptoren (BZR) bezeichnet.

Nach Kontakt mit einem Pathogen, werden von den B-Zellen initial, als primäre Immunantwort, IgM-Moleküle sezerniert. Ist das Pathogen nach dieser primären Immunantwort noch vorhanden, erfolgt die sekundäre Immunantwort, in deren Verlauf die B-Zellen einen anderen Isotyp, meist IgG, exprimieren. Dies wird als Klassenwechsel (*class switch*) bezeichnet. Beim Klassenwechsel verändern sich nur die H-Ketten. Dies wird durch DNA-Rekombination erreicht, wobei einzelne DNA-Abschnitte herausgeschnitten werden.

### **1.4.2 Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper *in vitro***

Die von Köhler und Milsten erstmals 1975 beschriebene Hybridomatechnik (Köhler & Milstein, 1975) bezeichnet ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAk). In dieser Arbeit wird das von Kennett und Mitarbeitern (Kennett *et al.*, 1978) entwickelte Fusionsprotokoll zur Herstellung einer hohen Rate immortalisierter Hybridoma-Zellen verwendet: Hierbei werden Antikörper produzierende B-Zellen mit einer Tumorzelllinie (Myelomazelllinie) zur Fusion gebracht (Abb. 1.7). Die B-Zellen können unter gängigen Laborbedingungen nur begrenzt kultiviert werden. Myelomazellen sind ihrerseits stark deregulierte Tumorzellen. Durch die Fusion beider Zelltypen können die Eigenschaften der unsterblichen Myelomzellen auf die derart generierten Hybridomazellen übertragen werden. Diese sind nun in der Lage fast unbegrenzt Antikörper in großen Mengen und mit maßgeschneiderter Spezifität zu sezernieren (Abb. 1.7). Um B-Zellen zu erhalten, die mAk gegen ein bestimmtes Antigen sezernieren, wird einem Versuchstier (meist Maus oder Kaninchen) ein entsprechendes Immunogen injiziert. Dadurch wird die mAk-Produktion der B-Zellen initiiert. Um einen wiederholten Klassenwechsel von IgM bis hin zum IgG in der B-Zelle zu erreichen, wird das Immunogen in Abstand von 3 bis 4 Wochen mehrmals injiziert.

Nach erfolgreicher Immunisierung werden die B-Lymphozyten aus der Milz des Tieres selektiv aufgereinigt und mit Myelomzellen fusioniert. Um die Antikörper produzierenden Hybridoma zu selektieren, werden die Zellen in einem speziellen Medium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT-Medium) enthält, kultiviert. Aminopterin hemmt die Purin- und Pyrimidinsynthese und blockiert somit die Biosynthese von Nukleotiden.

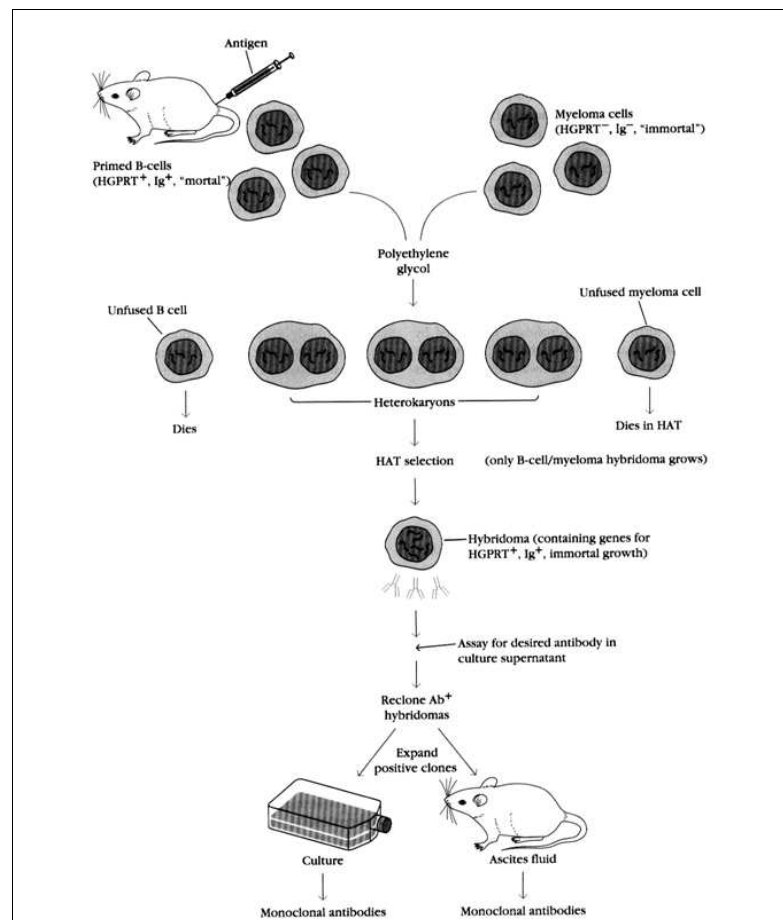


Abbildung 1.7: Prinzip der Immortalisierung reifer B-Zellen (aus Kuby Immunology)

B-Lymphozyten können über alternative Stoffwechselwege aus Hypoxanthin und Thymidin Nukleotide synthetisieren. Nicht-fusionierte Myelomzellen hingegen sind dazu nicht in der Lage, da sie einen genetischen Defekt aufweisen, der verhindert die Aminopterin-Blockade zu umgehen. Daher sterben diese im HAT-Medium ab. Es bleiben nur Hybridomzellen übrig, da nicht-fusionierte B-Zellen nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen. Um einen monoklonalen, spezifischen mAk zu erhalten, müssen positive Mischkulturen der Hybridomzellen vereinzelt werden. Nur ein Hybridomzellklon sezerniert einen spezifischen, monoklonalen mAk (Goding, 1980). Auf diese Weise erhält man mAk, die aus chemisch definierten Medien (Hybridoma-Kultivierungsmedium) leicht aufzureinigen sind und theoretisch unbegrenzt für die klinische Anwendung zur Verfügung stehen.

### 1.4.3 Gentechnische Verfahren zur Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente

Ein gentechnisches Verfahren zur Herstellung von Antikörperfragmenten ist die Expression in *E. coli*. Die cDNA-Sequenzen der C<sub>H1</sub>- und der V<sub>H1</sub> Domäne der schweren Kette und die L-Kette werden zu diesem Zweck in einen speziellen Expressionsvektor kloniert (Better *et al.*, 1988).

Rekombinante mAκ-Fragmente können in *E. coli* einfach und kostengünstig hergestellt werden (Skerra & Plückthun, 1988, Plückthun & Skerra, 1989). Kann auf die Effektorfunktion des Fc-Teiles verzichtet werden, werden lediglich die Fab-Fragmente zur Expression in *E. coli* gebracht. Soll der Fc-Teil ebenfalls exprimiert werden, so wird ein eukaryotisches Expressionssystem gewählt.

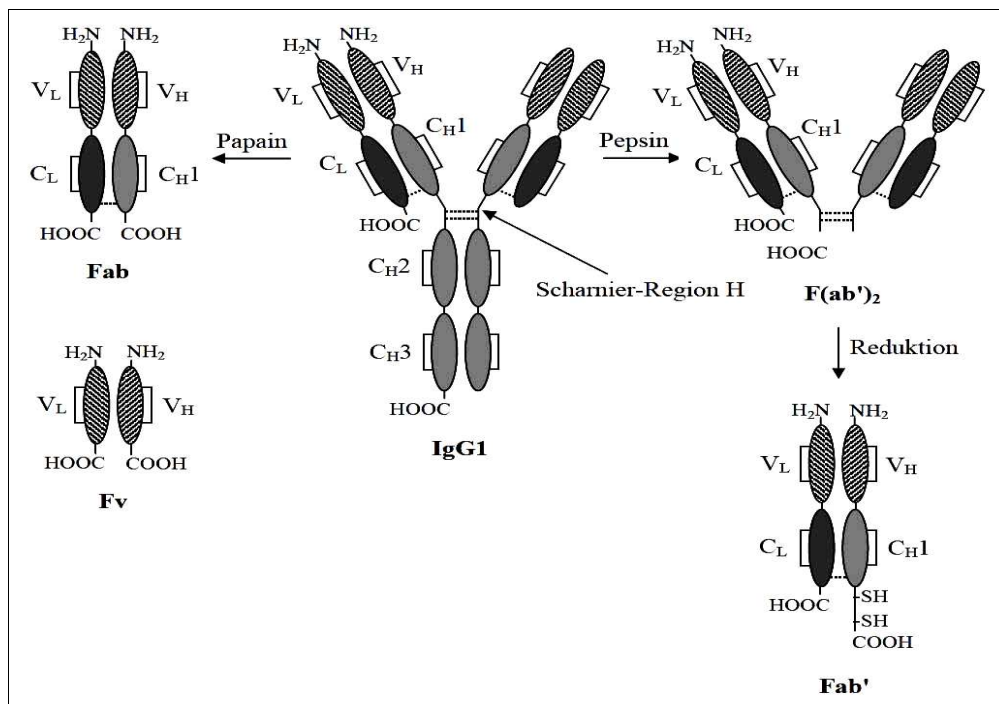


Abbildung 1.8: Antikörperfragmente, die durch Proteolyse erhalten werden können. Pepsin spaltet die schweren Immunglobulinketten in der Scharnier-Region, so dass als Produkt ein Fc-Fragment und das F(ab')<sub>2</sub>-Fragment mit den beiden Antigenbindungsstellen entsteht. Fab-Fragmente entstehen durch Proteolyse mit Papain. Die kleinste antigenbindende Einheit eines Antikörpers, ist das Fv-Fragment (Fragment Variable Domains), das lediglich aus den variablen Domänen beider Immunglobulinketten besteht (aus: Schlapsky, 2004)

Als limitierend für das bakterielle Expressionssystem stellt sich jedoch die funktionelle Faltung des Moleküls dar. Um ein biologisch aktives Molekül zu erhalten ist es notwendig, dass Disulfidbrücken exakt an den richtigen Stellen ausgebildet werden. Dies ist jedoch aufgrund des reduzierenden Milieus des bakteriellen Zytoplasmas nicht möglich. Daher müssen die in *E. coli* exprimierten Fragmente in den periplasmatischen Raum der Bakterienzelle gelangen (Collet & Bardwell, 2002). Der Transport wird durch eine N-terminal lokalisierte Leitsequenz (z.B. die Signalpeptide: *phoA* oder *ompA*) ermöglicht (Skerra & Plückthun, 1988, Skerra, 1994). Korrekt disulfidverbrückte Fab-Fragmente können in diesem oxidierenden Milieu generiert werden (Plückthun & Skerra, 1989; Zemel-Drease & Zamir, 1984).

Der geringe Ertrag an funktionellem Polypeptid kann durch eukaryotische Expressionssysteme, wie die in Hefen (*S. Cerevisiae* oder *P. pastoris*) etablierten, verbessert werden (Ridder *et al.*, 1995). Sie vereinen die Vorteile kurzer Generationszeiten und geringer Nährmedienansprüche mit denen der posttranslationalen Modifikationen des eukaryotischen Faltungs- und Sekretionsapparates (Voedisch *et al.*, 2005). Für die Herstellung großer Mengen korrekt gefalteter Antikörperfragmente wird die Produktion auf Hefen-Fermentation umgestellt.

## 1.5 Projektbeschreibung und Zielsetzung

Die Radioimmuntherapie mit dem *murinen* monoklonalen Antikörper BC-24 ist ein viel versprechender therapeutischer Ansatz zur Behandlung von WHO°III und WHO°IV Gliomen. Hierfür sind weitere klinische Studien dringend erforderlich, die jedoch aufgrund der limitierten Menge des mit großem Aufwand aufgereinigten Antikörpers BC-24 und der Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit Strukturen an gesunden Hirngewebe und der daraus resultierenden Beeinträchtigung der damit behandelten Patienten, nicht im erforderlichen Umfang durchführbar sind. Als vornehmliches Ziel muss daher die Bereitstellung eines nicht mit Epitopen der Tumor umgebenden gesunden Hirnarealen kreuzreagierenden Antikörpers gelten, der sich zudem leicht in großen Mengen und in homogener Form produzieren lässt.

Erste semi-quantitative PCR-Daten sollen im Rahmen dieser Arbeit mit genspezifischen Primern die tumorassoziierte *hTNC-1* Spleißisoform nachweisen und zeigen, dass eine Korrelation der Expression dieser Isoform mit dem Malignitätsgrad des Tumors auf mRNA Ebene vorhanden ist. Andere Arbeiten führten zwar immunhistochemische Nachweise des *hTNC* und weitere Arbeiten konnten im Western Blot an anderen Tumorentitäten (Darmkrebs, Brustkrebs) und nicht an Gliomen die *hTNC-1* Isoform nachweisen (Takeda *et al.*, 2007; Tsunoda *et al.*, 2003; Behrem *et al.*, 2005). Es konnte jedoch kein Nachweis der Korrelation zwischen Malignitätsgrad und *hTNC-1* Expression auf Protein- oder mRNA-Ebene an Gliomen geführt werden. Der Nachweis der Expression des *hTNC-1* wird durch die Amplifikation einer der alternativ gespleißten FNIII-Domänen, die nur in der *hTNC-1* vorkommt, mittels PCR von gesamt RNA erhoben und semiquantitativ ausgewertet.

Anschließend soll ein *muriner* monoklonaler Antikörper für die RIT hergestellt werden, der keine Kreuzreaktivität auf Proteinebene zu den anderen *hTNC* Isoformen oder anderen Proteinen zeigt und eine hohe Avidität (Gesamtheit der beiden Affinitäten der Fab-Regionen eines Antikörpers) gegenüber der *hTNC-1* Isoform aufweist. Dieser soll *in vitro* und *in vivo* vollständig charakterisiert werden. Parallel wird der BC-24 mAk gleichermaßen charakterisiert und seine Affinität bzw. Avidität mit dem neu generierten mAk verglichen.

Eine Verbesserung der klinischen Anwendung könnte es sein, einen für die *hTNC-1* Spleißisoform hochgradig selektiven Antikörper zu generieren. Der neue Antikörper soll die klinischen Nebenwirkungen, die aufgrund der Kreuzreaktivität des mAk BC-24 entstehen, minimieren (Carnemolla *et al.*, 1999; Viale *et al.*, 2002).

Bedingt durch die verbesserte Avidität des neuen mAk, wird auch eine höhere Konzentration des mAk am Tumor erzielt (Chiquet-Ehrismann, 2003). Ebenso kann

durch die verbesserte Avidität des neuen Antikörpers eine längere Verweildauer des Antikörper-Nuklid-Konjugates an der Tumorzelle erreicht werden.

Dieser mAk soll durch Immunisierung von Balb/c Mäusen mit einer der alternativ gespleißten FNIII-Domänen, die nur in *hTNC-1* vorkommt, generiert werden. Diese FNIII-Domäne wird hierzu gentechnisch hergestellt. Die Immortalisierung und klonale Selektion der erfolgreich herangereiften *murinen* B-Lymphozyten wird, angelehnt an das von Kenett und Mitarbeitern entwickelte Protokoll, durchgeführt (Kennett, *et al.*, 1978). Der Antikörper kann aus den konditionierten Zellkulturmedien des entsprechenden Hybridoma Zellklons praktisch unbegrenzt, mit geringem Aufwand aufgereinigt werden.

Aufgrund ihres kleinen molekularen Gewichtes (50 kDa) haben Fab-Fragmente eine kurze Plasmahalbwertszeit und eignen sich deshalb als mögliche Tracer für die nuklearmedizinische Bildgebung. Aber auch ihr Einsatz in der Therapie soll eine der Nebenwirkungen der RIT, nämlich die Entwicklung von HAMA (human anti-mouse antibody) durch den fehlenden Fc-Teil beheben. Ein weiterer großer Vorteil der Fab-Fragmente als Trägermolekül für die RIT ist, ebenfalls bedingt durch ihr kleines molekulares Gewicht, am Tumorrhöhlenrand weiter in das umliegende Gewebe durch Diffusion zu gelangen, um hier Tumorzellreste, die operativ nicht vollständig entfernt und auch mit einem Radionuklid konjugierten Antikörper nicht erreicht werden können, zu adressieren. Die gentechnische Herstellung und vollständige Charakterisierung von Fab-Fragmenten für die Differentialdiagnostik und der lokoregionalen RIT von Gliomen ist von daher ein zweites Ziel dieser Arbeit. Die cDNA-Sequenzen der C<sub>H</sub>1- und der V<sub>H</sub>1-Domäne der H- und der L-Kette des neu generierten mAk werden hierfür in den bakteriellen Expressionvektor pASK85-D1.3 (freundlicherweise von Prof. Skerra zur Verfügung gestellt) kloniert und gentechnisch hergestellt (Skerra, 1994). Dieses Fab-Fragment wird ebenfalls *in vitro* und *in vivo* charakterisiert. In dieser Arbeit sollte die Fab-Produktion in *E. coli* im Labormaßstab erreicht werden.



## 2 Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 RNA-Extraktion aus *humanen* Gliom-Biopsaten

Das Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation waren 50 mg schwere *humane* Gliom-Biopsate (Tumorbank der Neurochirurgischen Klinik der LMU). Diese Gewebeproben wurden auf Eis aufgetaut, wiederholt in flüssig-N<sub>2</sub> eingefroren und mit einem Mikrohomogenisator (Roth) mechanisch zerkleinert. Die derart vorbehandelte Gewebeproben wurden mit 800 µl TRIzol-Reagenz (Invitrogen) versetzt. Anschließend wird nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen) verfahren (Chomczynski, 1993). Die so gereinigte RNA wurde in mit DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Reinheit, Konzentration und Integrität der RNA wurden durch photometrische Bestimmung der Extinktionskoeffizienten E<sub>260nm</sub> und E<sub>280nm</sub> bestimmt. Es wurden nur RNA-Extrakte weiterverwendet, die eine Konzentration von ca. 10 µg/µl aufwiesen. Wurde mehr RNA isoliert als für die folgende Reverse Transkription notwendig ist, so wurde der Überschuss aliquotiert und bei -20°C für die Dauer eines Jahres bzw. bei -80°C für längere Zeit konserviert. Zusätzlich zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der gRNA wurde die Integrität dieser mittels analytischer Gelelektrophorese überprüft. Dafür wurden jeweils 1 µg gRNA elektrophoretisch in 1 x TBE aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

#### 2.1.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren einer Probe wurde photometrisch die Absorption bei 260 nm gemessen. Parallel zu diesem Wert wurde die Absorption bei 280nm bestimmt. Bei 280 nm zeigt die aromatische Aminosäure Tryptophan eine im Photometer messbare Absorption. Aus dem Verhältnis E<sub>260nm</sub> / E<sub>280nm</sub> lässt sich der Reinheitsgrad einer Nukleinsäure-Probe bestimmen (Sambrook, 1989). Die Konzentration isolierter und gereinigter DNA wurde unter Zuhilfenahme des molaren Extinktionskoeffizienten E<sub>260nm</sub> = 1 entsprechend 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und E<sub>260nm</sub> = 1 entsprechend 40 µg/ml RNA ermittelt (Sambrook, 1989). Die Konzentration einer RNA-Probe wurde wie folgt berechnet:

$$c(\text{RNA}) = E_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}.$$

### 2.1.3 Reverse Transkription und cDNA-Synthese

Die *in vitro* angewandte Reverse Transkription dient der Synthese einzelsträngiger cDNA von mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (Aatsinki, *et al.*, 1994). Hierfür wurden maximal 2 µg RNA zusammen mit dem polyT-Primer (12-18 Desoxythymidylate, 5 µM) oder einem genspezifischen Primer (GSP, 10 µM) und einem dNTP-Mix (2,5 mM, für jedes Nukleotid) für 5' auf 70°C erhitzt. Dieser Schritt diente der Denaturierung eventueller Sekundärstrukturen der RNA. In einem zweiten Schritt wurde erst die hitzesensitive Reverse Transkriptase (RT, 25U) zugegeben und die cDNA-Synthese bei 42°C und 1h lang in 1 x RT-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde die RT hitzeinaktiviert (5'/95°C) und 2U RNase H zugegeben, um an der Einzelstrang-cDNA haftende RNA-Fragmente abzuspalten. Die RT-Ansätze wurden im Anschluss für die PCR weiter verwendet oder bei -20°C gelagert.

### 2.1.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Zur selektiven Amplifikation von cDNA- und DNA-Abschnitten sowie zum Nachweis eines bestimmten Bereichs rekombinanter DNA innerhalb eines gentechnisch manipulierten Organismus wurde die „polymerase chain reaction“ (PCR) durchgeführt (Saiki, Gelfand *et al.*, 1988). Die Durchführung der PCR-Reaktionen erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Ausubel *et al.* (Ausubel, Brent *et al.*, 1994). Puffer, Lösungen und der Taq-DNA-Polymerase-Mix wurden vom Hersteller (Clontech) bezogen.

Pipettierschema zur Durchführung der PCR/12,5 µl Ansatz:

Template (0,1ng/µl)

- 0,5 µl/Polymerase-Mix (50x)
- 0,5 µl/5'-Primer (10 µM)
- 0,5 µl/3'-Primer (10 µM)
- 0,5 µl dNTP's (10 mM ea.)
- 2,5 µl 10 x Polymerase-Buffer
- 18 µl PCR-Grade-Water

Der fertige PCR-Mix durchlief in einem PCR-Thermocycler folgendes Programm:

- I. Denaturierung: 30"/95°C
- II. Annealing: 45"/55-68°C
- III. Elongation: 1'/68°C
- IV. Termination: 1'/68°C

Die Schritte I. bis III. bilden einen Zyklus, der je nach PCR-Programm 35-45 mal wiederholt wurde. Es wurden auch hier, parallel zu den eigentlichen Ansätzen, Kontroll-

Ansätze durchgeführt. Dazu wurde ein Teil eines sogenannten „Housekeeping genes“ in der positiv Kontrolle amplifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das ubiquitär im Menschen exprimierte  $\beta$ -Aktin-Gen gewählt und ein 564 bp langes Produkt von der  $\beta$ -Aktin cDNA mit folgendem Primer-Paar amplifiziert:

5'-h $\beta$ -ActinX00351(235-255)	TGG GAC GAC ATG GAG AAA ATC	(21 bp)
3'-h $\beta$ -ActinX00351(779-798)	GAA GGA AGG CTG GAA GAG TG	(20 bp)

Gleichzeitig diente dieses Primerpaar auch als Kontrolle für die Reinheit der hergestellten gRNA: eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA würden zur Amplifikation eines zweiten PCR-Produktes der Länge von ca. 1000 bp führen, da die Primer ein Exon des  $\beta$ -Aktin-Gens überspannen. Mit der Negativkontrolle konnten mögliche Kontaminationen der PCR mit Fremd-DNA ausgeschlossen werden. In diese Ansätze wurde keine Template-DNA gegeben. Die Reaktionsansätze wurden zu je 5-10  $\mu$ l auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und dokumentiert (siehe 3.1.6).

### 2.1.5 5'-RACE- Polymerase Ketten Reaktion (5'-RACE-PCR)

RACE steht für „rapid amplification of cDNA ends“ und bezeichnet die Vervielfältigung von bestimmten cDNA-Abschnitten von mRNA (Frohmann, 1993). Die 5'-RACE-PCR basiert auf einem bekannten strangabwärts gelegenen Gen-Bereich (hier konstante Region der Antikörperketten), wohingegen der 5'-Bereich unbekannt ist. Sie wurde mit einem einzigen genspezifischen Oligonukleotid (GSP1), der während der reversen Transkription an der entsprechenden mRNA bindet und strangaufwärts zur Synthese der cDNA des gesuchten Genes führt, gestartet (Loh, 1989). In einem zweiten Schritt fügt das Enzym „Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase“ (TdT) am 3'-Ende der cDNA ein (dC)-Homopolymer an. Die folgende „Nested-PCR“ amplifizierte, mit Hilfe eines nested GSP2-Gen-spezifischen Primers und eines sogenannten „abridged anchor primer (AAP)“, den gesamten strangaufwärts-Bereich dieses Genes (mitsamt des 5'-UTR). Der AAP besteht neben einer poly(G)-Sequenz am 5'-Ende aus weiteren Nukleotiden, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme für das spätere Klonieren sind. In der Regel reichen 45 Cycles der PCR aus, um genügend Amplifikate zu erzeugen, die anschließend elektrophoretisch analysiert und zum Sequenzieren kloniert werden können. Ansonsten wurde eine zweite „Nested PCR“ mit einem zweiten nested-GSP3- und einem sogenannten AUAP-Primer durchgeführt. Für die Synthese der Erststrang-cDNA wurde der Primer GSP1 0,25 pM zu einem 25  $\mu$ l Ansatz gegeben. Des weiteren wurden für diese erste Reaktion 1  $\mu$ g gRNA und bis zu einem Endvolumen von 15,5  $\mu$ l DEPC behandeltes ddH<sub>2</sub>O zugegeben. Zum Aufbrechen von Sekundärstrukturen an der

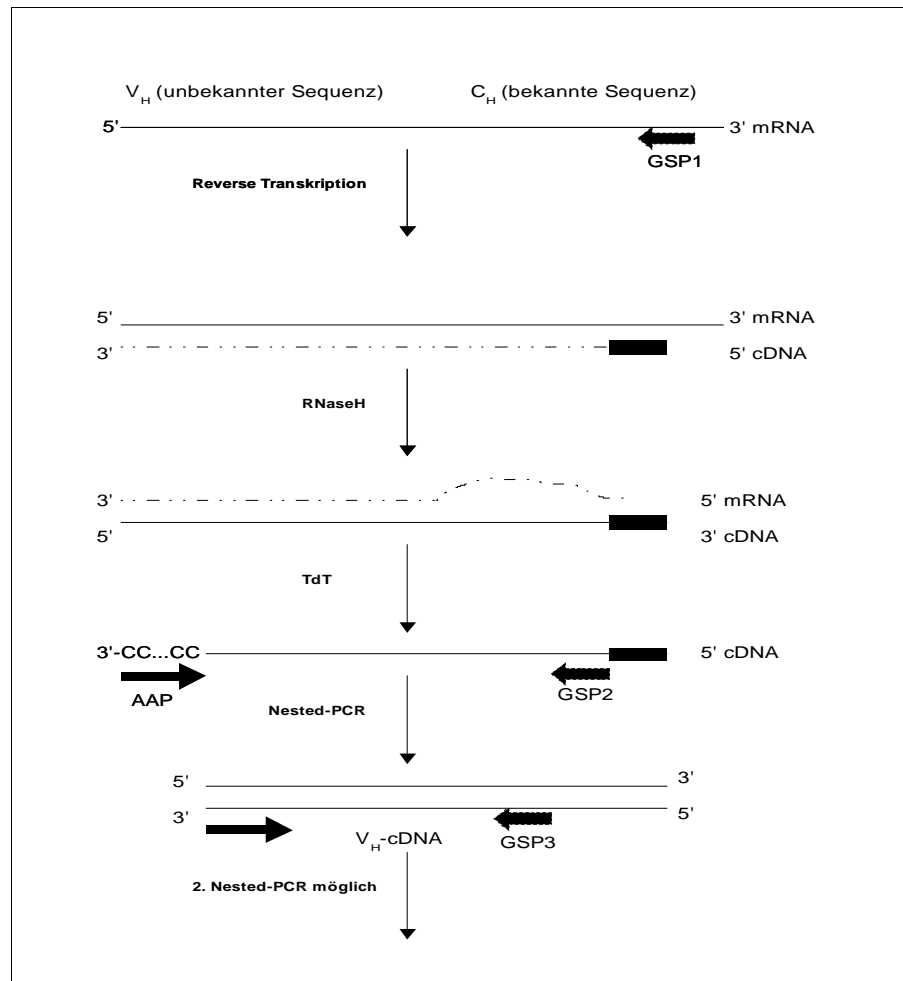


Abbildung 2.1: Reaktionen einer 5'-RACE-PCR zur Amplifikation von mRNA Regionen im 5'-Kodierungsbereich, ausgehend von strangabwärts gelegenen genspezifischen Primern (GSP)

RNA wurde das Reaktionsgemisch 10' lang bei 70°C inkubiert und sofort für 1' auf Eis gestellt. Anschließend wurden 200U der hitzesensitiven Reversen Transkriptase (SupersScript II RT, Fa. Invitrogen) zugegeben und die reverse Transkription bei 42°C und für die Dauer von 50' gestartet. Die RT wurde anschließend durch eine Inkubation bei 70°C/15' zerstört. Während des zweiten Schrittes der 5'-RACE-PCR wurden die noch an der cDNA haftenden RNA-Fragmente durch eine Inkubation des Ansatzes mit 2U RnaseH bei 37°C und 10' lang entfernt und die Reaktion auf Eis gestellt. Für die Synthese der doppelsträngigen cDNA wurden zuerst die im Ansatz vorhandenen Nukleotide und der GSP1 Primer durch eine sogenannte S.N.A.P.-Reinigung über eine Silica-Membran gereinigt (Vogelstein und Gillespie, 1979). In einer mit dem chaotropischen Salz Natriumiodid gesättigten Lösung binden DNA-Fragmente kleiner

200 bp an der Silica-Membran und die derart gereinigte cDNA kann mit ddH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert werden. 50 µl cDNA wurden hierzu mit 120 µl 6 M NaI versetzt und auf die Säule gegeben. Nach dem einmaligen Waschen mit eiskaltem 6 M NaI wurde mit eiskaltem 70% Ethanol zweifach gewaschen und im Anschluss mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O (65°C warm) die gereinigte cDNA eluiert. Für den dritten Schritt der 5'-RACE-PCR und der Synthese doppelsträngiger cDNA wurde die Anheftung des poly-d(C)-Restes an das 3'-Ende des ersten Stranges der cDNA durchgeführt. Hierzu wurden 2 mM dCTP und 5 µl 5 x Tailing-Buffer zu 16,5 ml S.N.A.P.-gereinigter cDNA gegeben. Nach einer einminütigen Inkubation bei 94°C wurde zum eisgekühlten Ansatz 2U Terminale Deoxynukleotid Transferase (TdT) zugegeben. Die TdT wurde 10' lang bei 65°C denaturiert. Von der, nun doppelsträngigen, cDNA konnte mittels „Nested PCR“ unter Standard-PCR-Bedingungen (2.1.4) und mit einem nested GSP2 und dem AAP Primer der entsprechende Genabschnitt vervielfältigt werden. Konnten nach dieser ersten PCR nicht genügend PCR-Amplifikate erzeugt werden, wurde eine zweite „Nested PCR“ mit einem nested GSP3 und einen AUAP Primer durchgeführt.

### **2.1.6 Elektrophoretische Auftrennung der DNA und RNA**

Zur Auftrennung der PCR-Amplifikate wurden die Proben in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer auf ein natives 0,7 bis 1,0%iges Agarose-Gel aufgetragen (Sambrook, 1989). Zur Herstellung eines Gels wurden 100 ml 1 x TBE -Puffer zusammen mit 0,8 bis 1,5 g Agarose in einer 250 ml Laborglasflasche in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurde dem Gel Ethidiumbromid (20 µl EtBr einer 10 mg/ml Stock-Solution/100 ml 1 x TBE) zum Anfärben der DNA/RNA unter UV-Licht zugesetzt. Die PCR-Amplifikate wurden mit Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Längenstandard in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von max. 100 mA durchgeführt. Der mit der DNA interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid (Sambrook, 1989) fluoresziert violett im UV-Licht (312 nm). Zur Dokumentation werden die Gele mit dem Gel Dokumentations System der Firma Syngene „GeneFlash“ abfotografiert.

## **2.1.7 Reinigung und DNA-Isolierung**

### **2.1.7.1 Reinigung von DNA-Fragmenten nach einer PCR**

Die Reinigung der DNA wurde laut Herstellerprotokoll und dem QIAquick PCR Purifikation Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) durchgeführt. Mit dieser Methode wurden PCR-Reaktionen aufgereinigt, die nur zur Amplifikation eines PCR-Produktes führten. PCR-Ansätze mit PCR-Produkten größer als 100 bp wurden mit 6 M Guanidinthiocyanat versetzt und an eine Silika-Gel-Membran adsorbiert, während andere Bestandteile (Oligo's, Nukleotide, Protein) ungehindert passieren können. Nach vollständiger Entfernung der Verunreinigungen durch einen Waschschrift mit 6 M Guanidinydrochlorid in Ethanol erfolgte die Elution der DNA mittels EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5). Ein derart gereinigtes PCR-Produkt kann nun beispielsweise für Klonierungsversuche verwendet werden.

### **2.1.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* - mittels Silicasäulen**

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* erfolgt laut Herstellerprotokoll und mit dem „illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit“ (GE Healthcare, Freiburg). Sie basiert auf der alkalischen Bakterienlyse (Birnboim & Doly, 1979) und der selektiven Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikamatrix. Es wurden immer Plasmide aus 5 ml Bakterienkultur als Ausgangsmaterial verwendet. Die Plasmid DNA wurde in 50-100 µl EB-Puffer eluiert (10 mM Tris-HCl, pH 8.5).

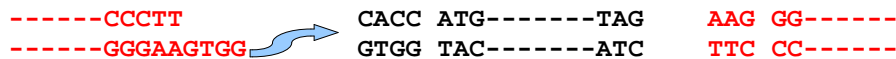
### **2.1.7.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* - Ammoniumacetatfällung**

Die in 200 µl EB aufgenommene DNA wurde mit 102 µl 8 M Ammoniumacetat und 800 µl 100% EtOH versetzt. Nachdem die Probe kurz zentrifugiert wurde, erfolgt die Fällung der DNA 30' lang auf Eis und 15' lang bei -20°C. Die DNA der Proben wurde nun 30' bei 13 000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand (*kurz: ÜS*) wurde verworfen und dieses so gewonnene DNA-Pellet mit 800 µl 70% EtOH gewaschen. Erneut wurde 30' lang bei 13 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der ÜS wurde erneut verworfen und das DNA-Pellet nun 30' bei 40°C getrocknet. Die so gefällte DNA wurde bei -20°C eingefroren bzw. zum Sequenzieren verschickt.

## 2.1.8 Klonierung von DNA-Fragmenten in bakterielle Plasmide

### 2.1.8.1 „Blunt end“- Klonierung in den pET151-Vektor

In dieser Arbeit wurden PCR-Produkte (schwarz) „blunt end“ und gerichtet in den VektorpET151 kloniert. Der Vektor (rot) ist für diese Zwecke Topoisomerase I verdaut und trägt ein überstehendes 5'-Ende (Shuman, 1991 und 1994):



Dieser Überhang kann aufgrund seiner hohen Bindungsenergie, die beim Spalten des Phosphodiesterbandes der Vektor-DNA durch die Topoisomerase I entsteht, am 5'-Hydroxyl-Ende des „blunt-end“ PCR-Produktes die Spaltung der H-Brückenbindungen bewirken. Die Topoisomerase I stellt die neue Phosphodiester-Verbindung her und führt die Ligation des zu klonierenden Inserts in den Vektor durch.

In der vorliegenden Arbeit wurden die für das Antigen kodierende cDNA „blunt-end“ in den Expressions-Vektor pET151/D-TOPO (Invitrogen) kloniert. Der Vektor ist Bestandteil eines Kits („Champion pET151 Directional TOPO Expression Kit“, Fa. Invitrogen), der neben pET151 die nötigen kompetenten TOP10 *E. coli* Zellen (dieser Stamm ist ein DH10B Abkömmling) enthält. Die cDNA-Sequenz, die für das Polypeptid kodiert, wurde in einer PCR mit folgenden Primern hergestellt:

5'TOPO: 5'- CACC /.... - 3' (Erkennungssequenz Topoisomerase I unterstrichen)  
 3'TOPO-TAG: 5'- CTA /..... - 3' (Stoppcodon unterstrichen)

Der 5'-TOPO-Primer enthält, zusätzlich zu den zur Gensequenz homologen Nukleotiden, weitere vier Nukleotide (unterstrichen), die die Topoisomerase I als Substrat benötigt. Der 3'- TOPO-TAG-Primer enthält das Stoppcodon TAG (unterstrichen). Das Stoppcodon dient für die spätere Expression des Peptides als Terminationscodon. Das „blunt-end“ PCR-Produkt wurde nach der PCR elektrophoretisch analysiert und mit dem „QIAquick PCR Purifikation Kit“ (Fa. QIAGEN) aufgereinigt (3.1.7.1). Der linearisierte Vektor pET151 wurde anschließend in verschiedenen molaren Verhältnissen mit dem PCR-Produkt im Arbeitspuffer der Topoisomerase I 10' bei RT inkubiert. Für die Ligation von 0,015 pmol des 600bp langen PCR-Produktes in den pET151/D-TOPO (5760 bp) in einem molaren Verhältnis von 1 zu 1, wurden 20 ng des Vektors (~ 0,015 pmol) mit 3,75 ng des PCR-Produktes (~ 0,015 pmol) inkubiert. Das neue Vektor-Konstrukt wurde sofort nach der Ligation für die Transformation der Bakterien-Zellen eingesetzt.

#### **2.1.8.2 TA-Klonierung in den pCR2.1-Vektor**

Für eine effiziente und schnelle Insertion von PCR-Produkten in einen Vektor zur Überprüfung der amplifizierten cDNA mittels Sequenzierung wurde die „blunt end“-Klonierung in den pCR2.1 Vektor der FA. Invitrogen durchgeführt (Shuman, 1991 und 1994). Die PCR-Produkte wurden entweder unter Standard-PCR-Bedingungen oder mittels 5'-RACE-PCR erzeugt (2.1.4/2.1.5). Durch eine spezielle Aktivität der Taq-Polymerase wurden einzelne Desoxyadenosinmonophosphate an das 3'-Ende der PCR-Produkte angefügt. Der linearisierte Vektor pCR2.1 des TOPO TA Cloning Kits (Fa. Invitrogen) besitzt am 5'-Ende einzelne Desoxythymidinreste, die kovalent mit einer DNA-Topoisomerase verknüpft sind und somit eine effiziente Ligation mit den PCR-Produkten ermöglichen (TA-Klonierung). Es wurden 4 µl (40-120 ng) des gereinigten PCR-Produktes mit 1 µl (10 ng) des linearisierten Vektors bei Raum-Temperatur für 5' ligiert. 2 µl des Ligationsansatzes wurden sofort zur Transformation chemikompetenter TOP10-*E. coli* (50 µl) zur Vervielfältigung des neuen Vektorkonstrukts verwendet.

#### **2.1.8.3 Gerichtete Klonierung in den pASK85-D1.3-Vektor**

Zur Klonierung oder Integration eines bis zu 1 kb großen doppelsträngigen DNA-Abschnittes (Insert) in einen bakteriellen Vektor (Plasmid) wurden PCR-Produkte mit solchen Primern vervielfältigt, die neben der zum Gen homologen Sequenz am 5'-Ende eine Nukleotid-Erkennungssequenz (Palindrom) von meistens 6 bp Länge enthielten, die den Verdau des Inserts mit Restriktionsendonukleasen ermöglichten (Scharf *et al.*, 1986). Der Vektor trägt ebenso diese Schnittstellen. Es entstehen überstehende Einzelstränge (klebrige Enden oder "sticky ends"). In der folgenden Ligation können nun mit Hilfe der T4-DNA-Ligase die beiden DNA-Moleküle miteinander verbunden/ligiert werden.

#### **2.1.8.4 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA**

Der Vektor pASK85-D1.3 und die Insert-DNA (hier  $V_H$ - und  $V_L$ -cDNA) wurden mit den Restriktionsendonukleasen PstI und BstEII für die  $V_H$ -cDNA und mit SacI und XhoI für die  $V_L$ -cDNA doppelverdaut. Die  $V_H$ - und  $V_L$ -cDNA tragen an ihren Enden die entsprechenden Palindrom-Sequenzen, die Schnittstellen für die jeweiligen Enzyme, die wie unter 2.1.8.3 beschrieben eingeführt wurden. 2,2 µg Vektor-DNA oder cDNA wurden mit jeweils 10U Restriktionsendonukleasen versetzt und in NEB-Puffer (vom Hersteller mit dem Enzym mitgeliefert) bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Nukleasen bei 80°C hitzeinaktiviert. Die Vektor-DNA wurde anschließend mittels Gelextraktion (2.1.72) gereinigt, um das ca. 300 bp lange exzisierte



DNA-Fragment aus der Lösung zu entfernen. Analog wurde die V<sub>L</sub>-cDNA mit SacI und XhoI doppelverdaut.

### 2.1.8.5 Ligation von „sticky-end“ DNA-Fragmenten

Die nach dem Verdau mit Restriktionsnukleasen isolierten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Der linearisierte Vektor (100 ng) wurde nun in einem bestimmten molaren Verhältnis mit dem verdauten Insert im Ligase-Puffer gemischt und 1 h bei 22°C mit 1U T4-DNA-Ligase inkubiert (Endvolumen 20 µl). Die molare Menge an restriktionsverdautem Insert wurde mit nachstehender Formel (Cranenburgh, 2004) errechnet:

Die Ligase wurde für 5' bei 70 °C hitzeinaktiviert.

5 µl dieses Ligationsansatzes wurden zur Transformation von 50 µl kompetenter *E. coli* verwendet.

$$V_v = \frac{T}{\frac{V_c \cdot I_l \cdot I_r}{I_c \cdot V_l} + 1}$$

### 2.1.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen erfolgten nach der von Sanger und Mitarbeiter (Sanger, *et al.* 1992) beschriebenen Kettenabbruch-Methode. Sie beruht auf dem zufälligen Einbau eines von vier 2', 3'-Dideoxyribonukleotiden in eine vorgelegte DNA und dem darauf folgenden statistischen Kettenabbruch aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am 3'-Ende, während der Polymerisierungsreaktion.

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Illustra Plasmid Prep Mini Spin Kit der Firma GE Healthcare isoliert. Nach der Konzentrations- und Qualitätsbestimmung wurden 300 ng der Vektor-DNA zur Sequenzierung an die Firma Sequiserve GmbH/Vaterstetten gesendet. Die Elektropherogramme wurden mit der DNASTAR-Software (1999, Madison) ausgewertet.

## 2.2 Gentechnische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Kultivierung der Bakterienstämme erfolgte in autoklaviertem LB-Medium, mit entsprechenden Zusätzen von Antibiotika, bei 37°C im Rundschüttler (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Anzucht von Einzelkolonien wurden Antibiotika-haltige LB-Agar-Platten verwendet. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt bzw. das von der Firma Sigma-Aldrich kommerziell erhältliche Luria Agar

verwendet. Zur Selektion wurden *E. coli* Kulturen auf Antibiotika haltigen LB-Agar Platten in drei verschiedenen Dichten ausgebracht (2.2.3). Eine LB-Agar-Kontrollplatte ohne Antibiotika wurde mit der gleichen Kultur angeimpft. Die ausgebrachten Bakterien-Kulturen wurden über Nacht (*kurz*: ÜN) im 37°C Brutschrank inkubiert. Zur langfristigen Lagerung wurden Bakterien-Dauerkulturen angelegt. Es wurden Bakterienkulturen der stationären Phase bei -80°C in einem Glycerin-haltigen LB-Medium ohne Antibiotikazusatz konserviert. Es wurden sowohl die Ursprungskulturen, als auch alle rekombinanten Bakterien-Klone derart gesichert.

### **2.2.2 Herstellung chemikompetenter *E. coli* JM83-Zellen**

Für diese Art von Transformation wurden die Membranen von *E. coli* Zellen durch Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  vorübergehend für DNA, mittels der Methode von Hanahan und Blomm (1996), durchlässig gemacht. 5 ml LB-Medium wurden mit einer Dauerkultur angeimpft und bei 37°C und 270 rpm (Inkubator mit Orbital-Schüttel-Funktion) über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden wiederum 100 ml LB-Medium (mit dem Zusatz von 20 mM  $\text{MgSO}_4$ ) mit 1,25 ml der ÜN-Kultur angeimpft. Diese Flüssig-Kultur wurde bis zum Erreichen einer optischen Dichte von  $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0,35$  bis 0,4 (log-Phase) kultiviert. Die Zellen dieser Kultur wurden sofort 10' lang auf Eis inkubiert und sukzessive bei 4 500 x g (4°C/5') pelletiert. Das Zellpellet wurde in ~ 40 ml eiskaltem TFB1 aufgenommen und für 10' auf Eis inkubiert. TFB1 und TFB2 enthalten das Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ), welches die Membran der *E. coli* durchlässiger macht. Erneut wurden die Zellen bei 4 500g (4°C/5') zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in ~ 8 ml eiskaltem TFB2 aufgenommen und 15' auf Eis inkubiert. Die Zellen sind nun kompetent. Sie wurden à 200 µl aliquotiert und bei -80°C etwa bis zu zwei Monaten aufbewahrt oder sofort transformiert. Die *E. coli* Stämme BL21 und TOP10 wurden von der Fa. Invitrogen chemikompetent erworben.

### **2.2.3 Transformation und Selektion chemikompetenter *E. coli* TOP10-, BL21(DE3)- und JM83-Zellen**

Die bei -80°C eingefrorenen (je 50 bzw. 200 µl aliquotiert) kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut, mit 100 ng DNA gemischt und zur Absorption der DNA an die Zellen 10' auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C für maximal 90''. Die Zellen wurden anschließend auf Eis inkubiert (ca. 5' lang) und in 1 ml bereitgestelltes SOB/SOC-Medium (950 µl SOB + 50 µl SOC) aufgenommen. Nachdem die Kulturen bei 37°C und 270 rpm erneut die log-Wachstumsphase erreichten (nach ca. 50'), wurde diese Zellsuspension (1200 µl) wie

folgt aufgeteilt: 2 x 100 µl, 1 x 350 µl, 1 x 650 µl, kurz zentrifugiert, der Überstand bis auf etwa 100 µl verworfen und die Zellen wie folgt auf geeignete selektive LB<sub>amp</sub>- bzw. (bei BL21 LB<sub>amp/cam</sub>) - Agarplatten ausgebracht: 1 x 100µl als Positivkontrolle auf eine LB-Agarplatte, die restlichen Aliquote auf LB<sub>amp</sub>- bzw. LB<sub>amp/cam</sub>-Platten ausgebracht und ÜN bei 37°C inkubiert. Von erfolgreich selektionierten Kolonien wurden Flüssigkulturen inokuliert. Parallel dazu wurde eine sogenannte Masterplatte überstempelt. Aus den TOP10-Flüssigkulturen wurden die entsprechenden Plasmide isoliert. Eine anschließende Kontroll-PCR wurde mit einem Primer, der an der Vektor- und einem der an der Insert-Sequenz bindet, durchgeführt. Die Insert-Sequenz wurde mittels Sequenzierung verifiziert (Fa. Sequiserve, Vaterstetten & ABI Prism 3730 Kapillarsequenziergerät). Plasmide, welche das korrekte Insert beinhalteten, wurden zur Transformation des *E. coli* Expressionsstammes BL21 (DE3) bzw. JM83 verwendet. Einige der erfolgreich transformierten und selektionierten Kolonien wurden cryokonserviert und konnten im Folgenden zur Expression des klonierten Polypeptides eingesetzt werden. Eine Charakterisierung dieser so erhaltenen Kolonien war nicht nötig, da diese mit dem rekombinanten Vektor transformiert wurden, der aus einem positiven TOP10-Klon stammt. Negative Klone würden die Antibiotika-Selektion nicht überleben.

#### **2.2.4 Heterologe IPTG-induzierte Expression rekombinanter His<sub>6</sub>-tagged Polypeptide in *E. coli***

Eine 10 ml Übernachtskultur wurde mit einer entsprechend transformierten BL21 (DE3) Kolonie angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Nach 16 h wurden zwei 1 l Erlenmeyerkolben mit je 250 ml LB<sub>amp/cam</sub> gefüllt, gleichermaßen mit der 10 ml Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 – 0,5 bei 270 rpm und 37°C im Schüttler inkubiert (log-Wachstumsphase). Sobald diese OD erreicht war, wurde mit 1 mM IPTG (2,5 ml einer 100 mM Stammlösung pro 250 ml Zellkultur) induziert, und die Zellkultur für weitere 3 h unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden in 50 ml Cellstar-Röhrchen durch Zentrifugation 3 280 x g/10'4 °C geerntet und das Gewicht des Zellpellets bestimmt. Der ÜS wurde entweder bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Auf etwa 1,5 g Zellgewicht werden etwa 3 ml Puffer B gegeben. Durch kräftiges Vortexen wurden die Zellen resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation des Lysats bei RT erfolgte die Zugabe eines Protease Inhibitor Cocktails – die folgenden Angaben beziehen sich dabei auf die resuspendierten Zellen in Sonicating-Puffer (in ml): Aprotinin 10 µl/ml ≈ 0.05 - 0.1 U, Leupeptin (50 mg/ml) 1 µl/ml, Pepstatin (50 mg/ml) 1 µl/ml, PefablocSC (10 mg/ml) 1 µl/ml und E64 (100 mg/ml) 1 µl/ml. Das so

erhaltene Lysat wurde mit 10 Impulsen je 30'' lang einer Ultraschallbehandlung unterzogen (sonifiziert) und mit einer 10%igen Triton X 100-Lösung (Endkonzentration 2%) versetzt – so wurden unspezifische Interaktionen zwischen dem His<sub>6</sub>-Tag des Peptids mit anderen Proteinen und somit die Koelution dieser während der Aufreinigung des Peptids vermieden. Ein 5 µl Aliquot wurde für die sich an die Reinigung anschließende SDS-PAGE/Silberfärbung entnommen. Es konnte ohne weitere Behandlungen des Lysats, wie Filtration oder Zentrifugation von etwaig vorhandenen größeren Zellfragmenten mit der affinitätschromatographischen Reinigung begonnen werden, da die „HisTrap FF crude“-Säulen der Fa. Ge Healthcare verwendet wurden. „Crude“ bezeichnet die Eigenschaft dieser Säulen, nicht durch ungenügend homogenisierte Zell-Lysate zu verstopfen (größere Porenweite der Säulenmatrix aufgrund von „Spacern“).

Um eine gute Reinigung zu gewährleisten, sollte das Zell-Lysat vollständig aufgeschlossen sein. Die folgende Chromatographie beruht auf dem Prinzip der Bindung eines His<sub>6</sub>-tagged-Peptids an der mit Nickel-Ionen beladenen Nickel-IDA-Agarose-Säule. Exprimiert wurde nicht nur die für das Peptid kodierende Sequenz, sondern auch der für die Ni-IDA-Reinigung benötigte Histidin-Rest bestehend aus 6 Histidinen. Dieser sogenannte His<sub>6</sub>-Tag bindet Aufgrund der eigenen negativen Ladung an die positiv geladenen Nickel-Ionen der Säule. Diese koordinative Bindung wurde erst mit stark sauren Puffern - hier während der Elution des Peptides von der Säule – wieder gelöst.

### **2.2.5 Heterologe Tetracyclin-induzierte Expression rekombinanter His<sub>6</sub>-tagged Polypeptide in *E. coli***

Der hier verwendete Expressionsvektor (hier pASK85-D1.3) kodiert für das Strukturgen des zu produzierenden Proteins als Fusion mit dem Gen für eine bakterielle Signalsequenz (OmpA bzw. PhoA), wodurch die Sekretion der Polypeptidkette (hier Fab-Fragment) in den periplasmatischen Raum von *E. coli* möglich ist (Skerra & Plückthun, 1988). Das derart exprimierte Protein wurde anschließend aus der Periplasmafraktion durch selektive Permeabilisierung der äußeren Zellmembran der *E. coli* aufgereinigt.

Eine 50 ml Übernachtskultur wurde mit einer entsprechend transformierten Kolonie des *E. coli*-Stammes JM83 angeimpft und bei 30°C/200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden 2 x 1 l LBamp-Medium in je einem 2,5 l fassenden Erlenmeyerkolben mit je 20 ml der Übernachtskultur gleichermaßen angeimpft. Die Kultur wurde bei 22°C / 200 rpm so lange weiter kultiviert, bis die Kultur die log-

Wachstumsphase erreichte (nach ca. 3½ – 4½h). Dies wurde durch stündliche Messung der Optischen Dichte (OD) geprüft. Die Expression des Polypeptids wurde für 3 h, nachdem die Kultur eine OD550 von 0,4 bis max. 0,5 erreicht hat, mit 200 µl Anhydrotetracyclinlösung in DMF (2 mg/ml; Endkonzentration: 0,2 µg/ml) induziert.

Die Zellen wurden in 50 ml Cellstar-Röhrchen durch Zentrifugation 3 280 x g/10'/4°C geerntet und das Gewicht des Zellpellets bestimmt. Der ÜS konnte entweder bei -20°C eingefroren oder weiterverarbeitet werden. Das Zellpellet wurde in 20 ml eiskaltem Saccharose-Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) schonend resuspendiert und für 30' aus Eis inkubiert.

Anschließend wurden die sich bildenden Sphäroplasten bei 3 200 x g/ 10'/4°C pelletiert. Der trübe Überstand wurde in einem zweiten Zentrifugationsschritt (17 200 x g/15'/4°C) geklärt. Für die folgende Reinigung des in dieser periplasmatischen Zellfraktion enthaltenen rekombinant exprimierten Proteins mittels Affinitätschromatographie wurde dieser gegen Chromatographie-Puffer ( 500 mM Betain, 50mM NaP<sub>i</sub>, pH 7.5) dialysiert.

Die so behandelte periplasmatische Zellfraktion konnte wiederum bei -20°C eingefroren oder direkt der Metallchelat-Chromatographie (IMAC) unterzogen werden.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Säulen-Chromatographische Reinigung des Antigens mittels IMAC

#### IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)

Rekombinant hergestellte Polypeptide wurden affinitätschromatographisch an immobilisierten zweiwertigen Metall-Ionen (komplexiert an einen chelierenden Liganden) gereinigt (Porath *et al.*, 1975).

Die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine trugen am N-Terminus Oligohistidin-Sequenzen und konnten wegen der ausgeprägten Affinität dieser Histidinreste zu chelatisierten Metallionen chromatographisch gereinigt werden (Hochuli *et al.*, 1988; Skerra *et al.*, 1991b). Die hier verwendeten Ni-IDA-Säulen (Fa. GE Healthcare) sind mit dem zum Teil vernetzten Säulenmaterial der Chelating Sepharose Fast Flow fertig gepackt. An die Sepharose ist der Chelator Iminodiacetic Acid, kurz IDA, kovalent gebunden und mit Nickel beladen. Das Bettvolumen der Säulen betrug 1 ml. Zum äquilibrieren der Säule wurde mit je 5 ml ddH<sub>2</sub>O und Buffer B gewaschen. Das Lysat wurde zwei Mal mit einer Laufgeschwindigkeit von ca. 0,2 ml/Minute auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule solange mit Puffer B

gewaschen, bis die Proteinkonzentration, gemessen an der Absorption bei 280 nm, weniger als 0,1 mg/ml betrug. Analoges galt für den Waschschriff mit Puffer C und D. Die Elution erfolgte mit Puffer E bei einem stark saueren pH Wert von 4,5. Um das Peptid zu „schonen“, wurde es während der Elution in basischem TRIS-Puffer, pH 9 aufgefangen. So wurde vermieden, dass sich das Peptid durch den saueren pH-Wert (Elutionspuffer) irreversibel entfaltet. Die Säule konnte nun mit einer 20%igen-Ethanol-Lösung von am Säulenmaterial noch haftenden Proteinen, Lipiden, *etc.* gesäubert werden und so bei 4°C für die nächste Reinigung aufbewahrt werden.

Aliquote ausgewählter Waschschriffe und jeder eluierten Fraktion wurden anschließend elektrophoretisch im SDS-PAGE analysiert und die aufgetrennten Proteine mit Silbernitrat angefärbt. Der Verlauf der Chromatographie und die Reinheit der Fraktionen, die das eluierte Peptid enthalten, konnte auf diese Weise beurteilt werden. Die reinen Fraktionen (mind. 90% Reinheit) wurden vereint, und der pH-Wert wurde auf pH 7 eingestellt. Das Peptid konnte in diesem Urea-haltigen Puffer bei 4°C aufbewahrt werden. In dieser Umgebung sind große Proteine, wie Proteasen, soweit denaturiert, dass sie das Peptid nicht enzymatisch spalten können. Für die meisten Anwendungen wurde allerdings gegen physiologische Salzlösungen, wie PBS dialysiert. In diesem Puffer wurde das Peptid bei -20°C aliquotiert gelagert.

### **2.3.2 Säulen-Chromatographische Reinigung der F<sub>ab</sub>-Fragmente mittels IMAC**

Analog zu 2.3.1 erfolgte die Immobilisierung der Übergangsmetallionen hier ebenfalls durch chelatisierende chemische Gruppen, die auf einem Säulenmaterial fixiert waren. Hier wurde ebenfalls eine Sepharose-Matrix mit gebundenen Iminodiessigsäure-Gruppen (Chelating Sepharose Fast Flow) als Chelatbildner eingesetzt. Beladen wurde mit dem divalenten Übergangsmetallion Zn<sup>2+</sup>. Zur Metallbindung der rekombinant hergestellten Fab-Fragmente diente das C-terminale His<sub>6</sub>-Tag.

Zur Isolierung eines rekombinanten Proteins aus 20 ml Periplasmaextrakt wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml verwendet. Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Absorptionsmessung bei 280 nm dokumentiert. Der gegen Chromatographie-Puffer (500 mM Betain, 50 mM NaP<sub>i</sub>, pH 7,5) dialysierte periplasmatische Proteinextrakt (siehe 3.2.5) wurde sterilfiltriert. Die Säule wurde mittels einer peristaltischen Pumpe zunächst mit einer Flussrate von 20 ml/h betrieben und mit 20 ml Wasser bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Anschließend wurde die Säule mit genau 10 ml 10 mM ZnSO<sub>4</sub> beladen, mit 20 ml Wasser nachgespült und schließlich mit 20 ml IMAC-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die periplasmatische Proteinfraktion aufgetragen und bis zum

Erreichen der Basislinie mit MC-Puffer gewaschen. Die Elution der an der Säule gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 150 mM Imidazol/HCl in IMAC-Puffer, bei einer verringerten Flussrate von 10 ml/h. Nach ca. 40 ml Elutionsvolumen wurde meist die Basislinie erreicht. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von jeweils 2,5 ml aufgefangen. Nach der Elution wurde die Säule zur Entfernung der  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen mit 20 ml Regenerierungspuffer (1 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0) und anschließend mit 10 ml Wasser gespült. Der Proteingehalt der Eluatfraktionen und deren Reinheit wurde mittels SDS-PAGE bestimmt. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an reinem rekombinanten Protein wurden vereint, gegen einen geeigneten Puffer dialysiert und nach Sterilfiltration (0,2  $\mu\text{m}$ ) bei 4°C gelagert.

### **2.3.3 Affinitätschromatographische Protein A/G Reinigung der mAk**

Die serumfreien konditionierten Medien (250-500 ml) der monoklonalen Antikörper produzierenden Hybridoma wurden wie unter 3.3.4.3 beschrieben behandelt und an Sepharose immobilisiertem Protein A (Sigma-Aldrich) oder Protein G (GE Healthcare) gereinigt. Protein A oder G besitzt eine hohe Affinität zur Fc-Region der Immunglobulinketten. An Protein A binden die IgG Subklassen 1, 2 und 4 mit hoher Affinität, an Protein G zusätzlich auch IgG3. An die Protein A Säule von der Fa. Sigma kann eine Dialysesäule (5 ml) gekoppelt werden, welche die Elution des aufgereinigten Antikörpers in einen physiologischen Puffer ermöglicht. Für die Elution an den Protein G Säulen der Fa. GE Healthcare wurden die Elutionsfläschchen mit Neutralisierungspuffer vorbereitet, so dass hier ebenfalls gewährleistet ist, dass die Antikörper nicht längere Zeit dem stark sauren Elutionspuffer ausgesetzt werden.

Nach Äquilibration der Protein A Säule mit 10 Säulenvolumina Bindungspuffer (vom Hersteller mitgeliefert) wurde die in Bindungspuffer dialysierte Antikörperlösung auf die Säule gegeben. Parallel wurde die Dialyse-Säule mit 2 Säulenvolumina HEPES-Puffer oder PBS äquilibriert. Die Protein A Säule wurde anschließend solange gewaschen, bis keine unspezifisch an der Säule haftenden Proteine mehr eluiert werden ( $\text{OD}_{280\text{nm}} < 0,1$ ). Mit einem stark sauren Glycin-Puffer (pH 3,5) wurde der Antikörper eluiert. Es wurden 6 Fraktionen à 1 ml aufgefangen und die Proteinkonzentration bei 280 nm bestimmt. Fraktionen die einen  $\text{OD} > 0,2$  aufweisen wurden im SDS-PAGE analysiert.

Für die affinitätschromatographische Reinigung mit der Protein G Säule (GE Healthcare) wurden serumfreie konditionierte Medien nicht eingengt, sondern ÜN bei 4°C mittels einer FPLC-Pumpe auf die Säule gegeben. Anschließend wurde mit 20 mM  $\text{NaP}_i$ , pH 7,0 bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Die Elution erfolgte

manuell mit 0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7 in die mit Neutralisierungspuffer (1 M Tris-HCl, pH 9) vorbereiten Reagenzgläser. Fraktion à 0,5 – 0,6 ml wurden aufgefangen und die Proteinkonzentration bei 280nm bestimmt. Fraktionen, die einen OD > 0,2 aufwiesen, wurden im SDS-PAGE analysiert. Antikörper enthaltende Fraktionen wurden, wenn nötig, auf mindestens 2 mg/ml eingeeengt und nach PBS dialysiert (Entfernung des Glycins). Die Antikörperlösungen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### **2.3.4 Dialyse und Konzentration proteinhaltiger Lösungen**

Die sogenannten „PD-10“-Desalting-Säulen der Fa. GE Healthcare wurden zuerst mit 25 ml Dialysepuffer äquilibriert. 2,5 ml der Polypeptid-Urea-Lösung wurden gegen 3,5 ml PBS-Puffer ausgetauscht (Verlust von ca. 20% der Ursprungsmenge an Polypeptid). Ist die Konzentration des Polypeptids bestimmt worden (2.3.5), konnte die Polypeptid-Lösung aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden.

Ebenso wurde über Dialyseschläuche dialysiert. Hierzu wurden autoklavierte, in 50% (v/v) Ethanol gelagerte und, kurz vor Gebrauch, gut mit ddH<sub>2</sub>O durchgespülte Dialyseschläuche verwendet. Proteinlösungen wurden in den Schlauch eingefüllt und ÜN bei 4°C unter Rühren gegen den entsprechenden Puffer dialysiert.

Gering konzentrierte Proteinlösungen (unter 100µg/ml), wie konditionierte Zellkultur-Überstände, wurden mit Natriumazid (Endkonz.: 0,1%) versetzt, sterilfiltriert (0,2 µm) und mit Vivaspin-20/30 000 MWCO (Sartorius) Zentrifugalkonzentratoren sukzessive bei 4°C bis zum gewünschten Endvolumen aufkonzentriert. Anschließend wurde das Konzentrat mittels PD-10-Säulen (Fa. GE Healthcare) gegen den Bindepuffer (0,1% Natriumazid) für die spätere Protein A Affinitätschromatographie dialysiert.

### **2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte durch UV-Absorptionsmessung bei 280 nm und anschließender Berechnung mit der Formel nach Warburg und Christian (Warburg & Christian, 1941). Als Standard wurde BSA (1 mg/ml; Fa. Invitrogen) verwendet. Die Proteinmenge nach Warburg und Christian wurde über folgende Formel bestimmt:

$$C(\text{Protein in mg/ml}) = 1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260}$$

Diese Methode basiert auf der Bestimmung der Extinktion der Aminosäuren (As) Tyrosin und Tryptophan bei 280 nm. Die Störung durch Nukleotide oder Nukleinsäuren konnte durch Messung der Extinktion bei 260 nm eliminiert werden.



### **2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese - SDS-PAGE**

Diese Methode dient der Auftrennung von Proteinen in einer vertikalen Elektrophorese-Apparatur entsprechend ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen. In Abhängigkeit von ihrer einheitlich negativen Ladung (Denaturierung durch SDS), wandern Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Gel entlang des elektrischen Feldes in Richtung Plus-Pol. Es wurde das Bio-Rad-Criterion-System verwendet. Die vertikale Criterion-Apparatur erlaubt die parallele Elektrophorese zweier 0,75 mm dicker 4-20%iger Gradientengele (Fa. Bio-Rad). Die Gele selbst enthalten kein SDS. Damit die Proteine in einem annähernd denaturierten und kugelförmigen Zustand verbleiben, wurde ein Laufpuffer: 1x SDS-Laufpuffer (Lämmli, 1970) verwendet, der das für dieses denaturierende System notwendige SDS enthält. Dies ermöglicht, Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Alle auf das Gel aufgetragenen Proben wurden im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 2 mit Lämmli-Probenpuffer versetzt und etwa 5' bei 95°C hitzedenaturiert. Die Apparatur wurde während der schnellen Elektrophorese gekühlt und es wurde eine Spannung von 220 V angelegt. Mit der Criterion-Apparatur erreicht man eine Beschleunigung der Elektrophorese um 50%.

Für Antikörper, die für die N-terminale Edmann Sequenzierung elektrophoretisch aufgetrennt wurden, wurde glycinfreier 1 x Borat-Laufpuffer verwendet.

#### **2.3.6.1 Coomassie Färbung**

Zur Sichtbarmachung der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine eines Homogenats wurden die Proteine mit einer Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung direkt im Gel angefärbt. Diese Art der Färbung hat eine Nachweisgrenze von ca. 50 ng Protein pro Proteinbande und ist reversibel. Nach einer einstündigen Inkubation mit der Färbelösung, die neben dem Coomassie-Blau Essigsäure und Methanol zur Fixierung der Proteine enthält, kann der Farbstoff mit der gleichen Zusammensetzung (Essigsäure und Methanol) solange wieder herausgewaschen werden, bis nur noch die angefärbten Proteinbanden zu sehen sind, und die Proteine im Gel können nun beispielsweise geblottet werden.

#### **2.3.6.2 Silber-Färbung nach dem SDS-PAGE**

Die Silberfärbung dient dem Nachweis von Proteinen nach dem SDS-PAGE. Die Nachweisgrenze liegt hier bei etwa ca. 0,1 ng / Bande. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Nachdem die Proteine im Gel gut fixiert sind werden sie mit einer Silbernitrat-Lösung angefärbt, welche durch die Entwicklerlösung (alkalisches

Formaldehyd) zu Silber reduziert wird. Dieses färbt die Stellen, an denen Proteine vorhanden sind, schwarz.

Tabelle 2.1: Silberfärbung nach dem SDS-PAGE nach Heukeshoven und Dernick (1986)

Fixierlösung 1	30% Ethanol 10% Essigsäure	mind. 30' oder über Nacht schütteln
Fixierlösung 2	0,4 M NaAc; 0,5% Essigsäure pH 6; 30% Ethanol	frisch angesetzt: 2 ml Glutaraldehyd und 200 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> zugeben 60' lang schütteln
Waschlösung	~500 ml ddH <sub>2</sub> O	3 x 15' waschen
Färbelösung	100 ml ddH <sub>2</sub> O ; 0.5 ml 20% AgNO <sub>3</sub> ; 80 µl 37% Formaldehyd	immer frisch ansetzen
Waschlösung	~500 ml ddH <sub>2</sub> O	kurz schwenken
Entwicklerlösung	200 ml ddH <sub>2</sub> O; 5 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 80 µl 37% Formaldehyd	unter Beobachtung auf weißem Hintergrund schwenken, bis Banden sichtbar werden
Stopp-Lösung	50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA pH8	bis zu 60' anschließend wird die Stopp-Lösung gegen ddH <sub>2</sub> O ausgetauscht, um zu verhindern, dass das Gel milchig wird

### 2.3.7 N-terminale Proteinsequenzierung

Für die rekombinante Herstellung der in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen *murinen* Antikörper bzw. deren Fab-Fragmente wurden genspezifische Primer für die Amplifizierung der korrespondierenden cDNA-Abschnitte mittels PCR entworfen. Da die konstanten Regionen der Antikörper von wenigen Allelen im Maus-Genom kodiert werden und diese sich an nur wenigen Positionen in ihrer Nukleotidsequenz unterscheiden, kann in diesem Bereich der Antikörper-cDNA der am Antisens-Strang bindende Primer (kurz: 3'-Primer) gelegt werden. Die genetische Vielfalt der Antikörper spiegelt sich in ihren variablen N-terminal gelegenen Domänen wieder. Für den am kodogenen Strang bindenden Primer (kurz: 5'-Primer) wurde zuerst die N-terminale Aminosäuresequenz der Antikörperketten bestimmt. Hierzu wurden 10 µg eines Protein A gereinigten monoklonalen Antikörpers einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Borat-Laufpuffers ohne Glycin (100 mM Tris, 100 mM Borsäure pH 8,3; 0,1% w/v SDS) unterzogen. Anschließend wurde der Elektrotransfer auf eine Immobilon-P-Membran mit Transferpuffer (20% v/v Methanol in Borat-Laufpuffer) durchgeführt. Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde die Membran für 5 min in Coomassie-Blau-Färbelösung geschwenkt und bis zur Entfärbung des Hintergrunds mit Entfärbelösung gewaschen. Die Membran wurde mit bidestilliertem

Wasser gespült und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Für die Sequenzanalyse wurden die entsprechenden Banden der Schwer- und Leicht-Ketten des Antikörpers ausgeschnitten und von der Fa. Alphalyse, Dänemark sequenziert.

Die von Pehr Edman entwickelte Methode zur Sequenzierung von Aminosäuren, der sogenannte Edmann-Abbau, beruht auf die wiederholte Endgruppen-Bestimmung einer Peptid-Kette (Edman, 1949). Die Peptidkette wurde dabei schrittweise abgebaut und die N-terminale Aminosäure (AS) des Peptids durch Zugabe von Phenylisothiocyanat (PITC) markiert. In einem sauren Milieu wurde die Peptidbindung hinter dieser PTC-markierten N-terminalen Aminosäure gespalten. Dieser Vorgang ist wiederholbar. In der Regel erhält man eine Sequenzinformation von ca. 10 N-terminal gelegenen Aminosäuren.

## **2.4 Immunchemische Methoden**

### **2.4.1 Bestimmung des Antikörpertiters mittels ELISA**

ELISA (enzyme linked immunosorbant assay) (Engvall & Perlman, 1971; Goldsby *et al.*, 2003) ist eine schnelle Testmethode, um spezifische Antikörper – im Rahmen dieser Arbeit der IgG-Gehalt der Blutseren immunisierter Tiere – nachzuweisen. Diese hoch empfindliche Methode erlaubt den Nachweis von Immunglobulinen im picomolaren Bereich. Die Entwicklung des Antikörpertiters konnte derart mittels ELISA von Boost zu Boost verfolgt werden. An das Antigen, das an die Festphase gekoppelt wurde, binden Immunglobuline aus dem Zellkulturüberstand der Hybridoma Klone und werden mit einem sekundären, gegen den Fc-Teil der Maus-IgG gerichteten, Ziege-IgG nachgewiesen. An diesen sekundären IgG liegt eine alkalische Phosphatase gekoppelt vor (AP konjugierter GAM-IgG), die ihr Substrat (pNPP) umsetzt und dabei einen Farbumschlag des Reaktionsansatzes bewirkt, der mit Hilfe eines Photometers quantifizierbar ist. Für einen ELISA-Test wurde eine ELISA-Platte U96 (Fa. Greiner) verwendet. Diese Kunststoffplatte trägt 8 x 12 Vertiefungen, (*engl.*: Wells). Insgesamt benötigt man in diesem Fall 7 Reihen zu je 8 Wells. Für jedes zu testende Serum wurde eine Reihe Wells benötigt. Beim Testen der Seren, die mAk gegen das für die Immunisierung verwendete Antigen enthalten, werden das Preimmunserum - kurz PIS, und das 1.-, 2.-, 3.- und 4.-. Serum getestet. Zwei weitere Kontrollreihen werden gegen BSA getestet. Alle Reihen werden bis auf die Reihen 6 und 7 mit 10 µg/ml oder 0,5 µg Antigen/Well beschichtet. Das Antigen (AG) wurde in 1 x PBS verdünnt und es wurden mit 50 µl/Well AG in PBS beschichtet. Das AG bleibt, inkubiert man die Platte mindestens 16 h bei 4°C, durch adhäsive Kräfte an der Kunststoffoberfläche der Wells gebunden. Anschließend wurde überschüssiges AG aus den Wells gewaschen, indem

man die Wells 3 x mit je 300 µl 1 x PBS/Well behandelt. Anschließend wurden bei RT die noch freien Bindestellen an der Kunststoffoberfläche der Wells mit je 200 µl einer nicht kreuzreagierenden Proteinlösung, hier 5% BSA-Lösung in 1 x PBS, abgedeckt und nach 1 h mit 200 µl PBS pro Well dreimal gewaschen. Die Seren werden in einer 1 zu 3 Verdünnungsreihe, beginnend mit der 1. Zeile in die Wells gegeben. In die erste Zeile wurden 149 µl 0,25% BSA/PBS und 1 µl Serum gegeben (1 : 150). In die zweite Zeile wurden 50 µl aus der 1. Zeile + 100 µl 0.5% BSA/PBS (1 : 450) gegeben und so weiter bis zur 8ten Zeile wo eine Verdünnung des Serums von 1 : 328 050 erreicht wurde. Inkubiert wurde 1,5 h lang bei RT. Nicht gebundener mAk wurde durch 6 x Waschen mit 1 x PBS entfernt. Die Detektion der sich gebildeten AG/mAk-Komplexe erfolgte durch Bindung eines heterologen-Enzym-konjugierten Sekundär-Antikörpers, der gegen Maus-IgG's (Seren stammen von Mäusen) gerichtet ist. Dieser Sekundär-mAk wurde 1 : 10 000 in 0,5% BSA/PBS verdünnt und à 100 µl/Well zugegeben. Inkubiert wurde 1,5 h bei RT. Nichtgebundener Sekundär-mAk wurde durch 6 x Waschen mit 1 x PBS entfernt, wobei der letzte Waschschrift für eine bessere Aktivität der AP und einer schnelleren Farbentwicklung mit 1 x PBS, pH 9 durchgeführt wurde. 100 µl der frisch angesetzten Substratlösung (hier pNPP in Diethanolamin Puffer) werden pro Well zugesetzt. Die Messung des entstehenden gelben Farbstoffs erfolgte nach 15-30' im Photometer (Titertek Multiscan Plus; Thermoelektron) bei einer Wellenlänge von 405nm. Die Intensität der einsetzenden Gelbfärbung ist proportional der Menge an gebundenem mAk. Die Intensität der Farbentwicklung nimmt linear über die Zeit zu.

#### **2.4.2 Indirekter ELISA zur Selektion von Hybridoma Klonen**

Die primäre Selektion der aus der Fusion hervorgegangenen Hybridoma Klone erfolgte mittels indirektem ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) (Engvall & Perlman, 1971); Goldsby *et al.*, 2003) ähnlich wie unter 2.4.1 beschrieben.

Dazu wurden 96-Loch-Platten ebenfalls mit dem für die Immunisierung der Tiere verwendeten Antigen (10 µg/ml) in 1 x PBS (Biochrom) beschichtet. Die in der Hybridoma-Kultur konditionierten Medien bzw. Überstände (kurz: ÜS) wurden unverdünnt bei 4°C über einen Zeitraum von 12 h und bei 4°C auf die beschichteten 96-Well-Platten gegeben. Die Detektion erfolgte Analog zu 2.4.1.

Die monoklonalen Zell-Linien, deren konditionierte Medien hier positiv getestet wurden, wurden in serumfreiem Medium weiter kultiviert und mittels indirektem ELISA erneut getestet. Anschließend erfolgte die weitere Charakterisierung einiger weniger Klone, mit höchster Affinität zum AG, im Western Blot und immunhistochemisch.

### 2.4.3 Indirekter ELISA zur Bestimmung der Antigen Bindekapazität von mAk's und Fab-Fragmenten

Die Antigenbeschichtung erfolgte analog zu 3.4.1. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Oberfläche der 96-well-Platten mit „Protein free blocking buffer“ in PBS (Fa. Thermo) 1 h bei RT abgesättigt und erneut dreimal gewaschen. Das primäre Antikörpermolekül ist in diesem Fall ein Fab-Fragment, welches mit absteigender Konzentration: 100, 80, 60, 40 und 20 µg/ml zum AG gegeben und ÜN bei 4°C inkubiert wurde. Der sekundäre mAk, Anti-Mouse IgG/Fab-specific (Fa. Sigma-Aldrich) ist mit alkalischer Phosphatase konjugiert und wurde nach sechsmaligem Waschen für 2 h bei RT zugegeben. Es wurde erneut sechsfach gewaschen und mit 100 µl/Vertiefung mit pNPP entwickelt. Die Extinktion bei 405 nm wurde nach 15', 60', 90' und 120' bestimmt und der Untergrund (Negativkontrollen) abgezogen. Für die Negativkontrolle (Untergrund) wurden Vertiefungen mit 0,25% BSA abgesättigt. Des weiteren wurde eine weitere Reihe mit 8 Vertiefungen mit AG beschichtet und anschließend nur der sekundäre mAk zugegeben. Als Positivkontrolle wurde Serum immunisierter Mäuse (3.3.1.2) in einer Verdünnung von 1:150 – 1:1350 auf AG getestet. Die zeitabhängige Veränderung der Extinktion wurde mittels nichtlinearer Regression (Methode der kleinsten Quadrate) mit Excel-Solver modelliert.

### 2.4.4 Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper

Die Isotypisierung diente der Charakterisierung der Klassen bzw. Subklassen, der in dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörper (mAk). Für die Wahl der affinitätschromatographischen Methode, mit welcher die mAk aufgereinigt werden sollten, und für die Entwicklung Gen- bzw. Isotyp-spezifischer 3'-Primer für die Amplifikation der variablen mAk-Domänen für die Herstellung der rekombinanten Fab-Fragmente, war es wichtig, die Isotypen dieser mAk zu kennen.

Der Kulturüberstand der klonierten Hybridomas wurde hier ebenfalls zur Isotypbestimmung verwendet. Der Kit der Fa. Pierce enthält hierzu gegen die Schwere-Kette der Antikörper gerichtete anti-IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgA, -IgM beschichtete Membranstreifen. Ebenso ist im Kit eine Membran enthalten, die mit anti-λ-Leichte-Kette und anti-κ-Leichte Kette Antikörpern beschichtet ist. Dieser Kit erlaubt einen Isotypennachweis mit einer Empfindlichkeit, ähnlich dem mAk-Nachweis mittels ELISA. Aus diesem Grund werden Hybridoma-Kulturüberstände mit dem mitgelieferten Verdünnungspuffer 1 : 50 verdünnt auf die Membranstreifen aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10' entwickelt der Streifen eine rote isotypenspezifische Bande.

### 2.4.5 Immunfluoreszenznachweis von Antikörpern an Hybridoma

Der Nachweis der mAk-Moleküle an der Oberfläche der mAk-produzierenden Zellen – hier den Hybridomas – dient der Bestätigung, dass die in dieser Arbeit erzeugten monoklonale Hybridomazelllinien reine „Producer-Kulturen“ sind. Der Nachweis wurde mit einem polyklonalen in Kaninchen hergestellten anti-Maus-mAk, der FITC-konjugiert ist, geführt. Die Hybridomazellen werden in 24-Loch-Platten ausgesät und bis zum Erreichen der 70%igen Konfluenz kultiviert. Zur Fixierung wurden sie mit PBS gewaschen und mit je 500 µl 4% PFA pro Loch 15' lang inkubiert. Es folgen drei Waschschrte á je 10' in 1% BSA-PBS-Lösung (Wasch-Puffer). Um unspezifische Bindungen zu blocken wurden 200 µl Protein-Blockier-Lösung (Fa. Dako) dazugegeben und für 60' bei RT mit anschließend 3 x Waschen in Wasch-Puffer inkubiert. Folgend wurden je 200 µl des sekundären Antikörpers FITC rabbit anti-mouse (Fa. Dako) 1 : 40 verdünnt (Antibody Diluent, Dako) und für 60' bei RT auf die Zellen gegeben. Ab diesem Arbeitsschritt war es notwendig im Dunkeln zu arbeiten. Um auch die Zellen sichtbar zu machen, die keine mAk produzieren, wurden nach weiteren drei Waschschrten die Zellkerne mit DAPI (Dako) blau gegengefärbt. Dies erfolgte während eines Inkubationsschrittes von 5' mit einer 2 mg/ml konzentrierten DAPI-Lösung. Anschließend wurde abermals dreifach gewaschen und schließlich der Nachweis im Mikroskop (Zeiss) geführt und digitale Fotos erstellt.

### 2.4.6 Immundetektion am Western Blot

#### Western Blot

Nach erfolgtem SDS-PAGE können Proteine direkt im Gel durch eine Coomassie- oder Silber-Färbung sichtbar gemacht werden. Um einen spezifischen Nachweis eines bestimmten Proteins zu führen, wurden die so aufgetrennten Proteine auf eine beschichtete Kunststoffmembran übertragen und diese Membran, mit gegen das nachzuweisende Protein gerichteten Antikörpern (meist der Klasse IgG), inkubiert. Das Blotting wurde in dieser Arbeit mit dem erstmal 1984 von Kyhse-Andersen beschriebenen Semidry Blotting mit der Apparatur der Fa. Bio-Rad durchgeführt. Die Proteine wurden dabei aus dem Polyacrylamidgel entweder auf eine Nitrocellulose-Membran (*kurz*: NC-Membran) oder auf eine PVDF-Membran übertragen (Kyhse-Andersen, 1984).

**Assemblierung des Blots:** direkt im Anschluss an die Elektrophorese wurde das „Sandwich“ bestehend aus dem Gel, der Membran und Filterpapier für den Western Blot zusammengesetzt. Gel und Membran wurden 15' lang in Transferpuffer äquilibriert. Die Membran war auf die Größe der Gele zugeschnitten. Das hierzu

verwendete extra dicke Whatman-Filterpapier wurde ebenfalls auf die Größe der Gele zugeschnitten und vollständig in Transfer-Puffer getränkt.

**Transfer:** Der Transfer erfolgte durch Anlegen einer Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup>. Das Methanol im Transferpuffer erhöhte zwar die Bindungseffizienz der Proteine an die Membran, verringerte jedoch den Transfer hoch-molekularer Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel. Aufgrund dessen wurde für den Transfer hoch-molekularer Proteine ein Transfer-Puffer (TB) ohne Methanol verwendet. Eine gute Haftung der Proteine auf dem Blot war durch die Essigsäure-haltige Färbelösung, der nach dem Blotten durchgeführten Ponceau-Färbung, gewährleistet. Nach dem Blotten wurde das Sandwich vorsichtig auseinander genommen, die Membran in eine Glasschale mit Ponceau-Färbelösung gegeben und ca. 5' bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran einmal mit ddH<sub>2</sub>O gespült und anschließend in 1 x TBS-Puffer überführt und solange entfärbt, bis Protein-Banden erkennbar waren. Die Ponceau S-Färbung wurde fotografisch dokumentiert.

Für die N-terminale Edman Proteinsequenzierung der Antikörper-Ketten wurde der Transfer in Glycin-freiem Borat-Puffer (1 x Borsäure-Blotting-Puffer), dem Methanol zugesetzt wurde, verwendet. Die Aminosäure Glycin, die Bestandteil der Standard-puffersysteme ist, würde die N-terminale Edmann-Sequenzierung beeinträchtigen.

#### **Immundetektion am Western Blot: Immuno-Blot**

**Blockieren:** Um Protein freie Stellen auf der NC-Membran abzusättigen (die im Verlauf der Immun-Detektion eingesetzten Antikörper würden an diesen Proteinfreien Stellen unspezifisch an der Membran haften bleiben), wurde mit fettfreiem Milchpulver in TBS (Blockierlösung) 60' lang bei RT inkubiert, gefolgt von dreifachem Waschen mit TBS. Nach Inkubation der Membran mit dem primären mAk (meist 1 : 1 000 in Inkubationslösung/1 h/RT), der spezifisch ein bestimmtes Protein – genauer: Antigen – erkennt, wurde sechsmalig und jeweils 5' lang bei RT mit TBS gewaschen. Erst die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1 : 5 000/1 h/RT), der gegen den Fc-Teil des Erst-Antikörpers gerichtet und an den eine Peroxidase gekoppelt ist, liefert während der Detektion das gewünschte Signal. Der Längenstandard (jedes Protein des Markers enthält einen Steptavidin-Rest/Tag) wurde durch den mit dem sekundären Antikörper zugegebenen, gegen den Streptavidin-Tag gerichteten Antikörper und ebenfalls Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörper detektiert.

**Detektion:** Die Detektion erfolgte mittels Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazindion). Aktiviert wurde das Luminol durch einen Wasserstoffperoxid-Puffer, der kurz vor der Detektion zum Luminol gegeben wurde. Katalysiert wurde die Reaktion von der Meerrettichperoxidase, die an den sekundären - bzw. an den anti-

Streptavidin-Tag gerichteten Antikörper gekoppelt vorliegt. Bei dieser Reaktion oxidiert das Luminol und es entsteht neben dem Oxidationsprodukt blaues Licht der Wellenlänge 450 nm (Chemilumineszenz). Es wurden je 1 ml Luminol und Wasserstoffperoxid-Puffer gemischt und gleichmäßig über den Blot verteilt (Blot darf nicht austrocknen). Die NC-Membran wurde ca. drei Minuten inkubiert und in knitterfreier Folie verschweißt. Die Chemilumineszenz auf der NC-Membran schwärzt einen Röntgenfilm an der Stelle, wo sie entsteht, innerhalb von wenigen Sekunden. Durch eine längere Exposition des Filmes konnte eine Verstärkung des Signals erreicht werden, was diese Methode äußerst empfindlich macht. Der Film wurde anschließend entwickelt und ausgewertet. Die Nachweisgrenze liegt hier bei ca. 0,1 pg Protein pro Bande.

## **2.4.7 Immunhistochemie - Histologie**

### **2.4.7.1 Silanisierung von Objektträgern**

Um die Haftung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern zu verbessern, wurden diese silanisiert. Zuvor wurden die Objektträger von Schmutz und Fett befreit, um eine hohe Hintergrundfärbung zu vermeiden. Dazu wurden konventionelle Glas-Objektträger (VWR) in Glasschaukeln (VWR) für 5' in Glasküvetten (VWR) mit 100% Aceton (Sigma-Aldrich) getaucht und anschließend 5' bei 60°C im Brutschrank (Heraeus) getrocknet. Im Anschluss wurden die Objektträger ca. 5' auf RT abgekühlt und danach 15' in Glasküvetten mit 5%igem Silan (Triethoxysilylpropylamin) (Fa. Sigma-Aldrich) getaucht. Zur Fixierung des Silans auf dem Objektträger wurden diese für 5' in frisches 100%iges Aceton getaucht und anschließend 5' mit Millypore-Wasser (doppelt destilliertes Wasser) gespült. Die Objektträger wurden nun über Nacht bei 60°C im Brutschrank getrocknet. Nach dem Trocknen konnten die Objektträger bis zum Schneiden der Gewebe bei RT gelagert werden.



#### **2.4.7.2 Gewebefixierung und Einbettung nach der Cryo-(Gefrier-) Methode**

*Humane* Gewebe Biopsate (Tumor bzw. gesunde Hirnbiopsien vom Rande des Tumors) wurden gleich nach einer OP in der Tumorbank mit TB-Nummer und Diagnose aufgenommen und anschließend mit Hilfe eines Skalpells in Stücke einer Größe von ca. 0,5 x 0,5 x 0,3cm (BxLxH) geschnitten. Diese Stücke wurden in eine Plastik-Kassette gegeben (Tissue-Cassette, Thermo Shandon) und mit dem Einbett-Medium übergossen (Cryo-Matrix, Thermo Shandon). Anschließend wurden die eingebetteten Gewebestücke bei -20°C (länger -80°C) eingefroren (Gefrierfixierung). Nach Erreichen dieser Temperatur konnten Schnitte angefertigt werden.

#### **2.4.7.3 Herstellung von Schnitten nach der Gefrierfixierung**

Vor dem Schneiden wurde der Kryostat (Leica) auf -20°C heruntergekühlt, um ein Auftauen der Gewebelöcke und dadurch entstehende Probleme beim Schneiden zu verhindern. Sobald die optimale Schnitttemperatur erreicht war, wurde das Messer so eingestellt, dass die Schnittdicke 10 µm betrug. Das tiefgekühlte Cryo-Gewebe (-20°C) wurde mit Hilfe eines Klebers (Tissue Tec) auf dem Probenteller befestigt und 10' trocknen lassen. Anschließend wurde das Messer so in Position gebracht, dass erste dünne Schnitte angefertigt werden konnten. Diese wurden jedoch verworfen, bis die Schnittfläche eben und das Tumor- bzw. Normalhirngewebe im Gewebelöck sichtbar war. Diese Schnitte wurden jeweils zu Zweit an einen Objektträger bei RT an geschmolzen und sofort bei -20°C in einem Objektträgerkasten zur Aufbewahrung bis zur Durchführung der Immunhistochemie gegeben.

#### **2.4.8 Immunhistochemische Färbung von Cryoschnitten nach der LSAB-Methode**

Dieses hoch empfindliche Färbesystem (Labelled (Strept-) Avidin-Biotin – LSAB) mit dem biotinylierten sekundären Antikörper (trägt mehrer Biotin-Moleküle an seinem Fc-Teil) birgt den Vorteil gegenüber dem herkömmlichen System, dass an diese Biotinmoleküle mehrere Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase-Enzyme (engl.: HRP, horseradishperoxidase) binden können und dadurch eine enorme Verstärkung des positiven Signals am gefärbten Gewebeschnitten erreicht werden kann. Zusätzlich koppeln an jedes Streptavidinmolekül mehrere HRP-Enzyme, was eine zusätzliche Verstärkung des ursprünglichen Signals bedeutet. Die hohe Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) für Biotin (höchste bekannte Bindekonstante zwischen zwei Proteinen) macht dieses System erst möglich.

Die Schnitte wurden anhand des Protokolls des Dako-Kit (LSAB-Kit System HRP, Dako) gefärbt. Alle verwendeten Reagenzien waren im Kit enthalten. Zuerst wurden die Schnitte zur Gefriersubstitution (Eiskristalle werden rasch durch Aceton ersetzt, das Präparat erhält seine cryofixierte Struktur) 30'' in eiskaltes, 70% Aceton getaucht und danach 3 x 5' mit PBS gespült. Dann wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe eines Fettstifts (Dako Cytomatic Pen, Dako) eingekreist, um zu gewährleisten, dass die einzelnen Reagenzien das Gewebe überfluten. Um die endogene Peroxidase zu blocken, wurden die Schnitte 10' mit dem Peroxidase-Blocking Reagenz inkubiert und danach erneut 3 x 5' mit PBS gewaschen. Zum Blocken des Hintergrunds wurde das serumfreie Protein Blocking Reagenz aufgetropft und 1 h lang bei 60 °C im Wärmeschränk inkubiert. Anschließend wurde das Protein Blocking Reagenz vorsichtig abgekippt und die restliche Flüssigkeit mit Filterpapier abgenommen, wobei darauf zu achten war, dass das Gewebe nicht mit dem Papier in Berührung kommt. Abweichend vom Hersteller-Protokoll wurden als Primärantikörper die zu testenden Hybridoma-Zellkultur-Überstände verwendet. Dies ist möglich, da der Primärantikörper bei der LSAB Methode unkonjugiert vorliegt. Dazu wurden je 100 µl ÜS unverdünnt auf die Gewebeschnitte aufgetropft. Auf die Schnitte, die als Negativkontrolle dienten, wurde nur das Antikörper-Verdünnungsmedium gegeben. Als Positivkontrolle wurde der gereinigte mAk BC-24 aufgetragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5' mit Tris-Puffer/Tween 20 (0,1% Tween 20, pH 7,6) gewaschen und danach der biotinmarkierte Sekundärantikörper (Biotynilated Link), der gegen murines IgG gerichtet ist, aufgetragen und 20' bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte erneut ein Waschschränk von 3 x 5' mit Tris-Puffer/Tween 20. Anschließend wurde Streptavidin-Peroxidase aufgetropft und ebenfalls 20' bei 37°C inkubiert und im Anschluss wiederum 3 x 5min mit Tris-Puffer/Tween 20 gewaschen.

Um die Zellen sichtbar zu machen, wurde DAB (3,3'-Diaminobenzidin) als Chromogen für die Peroxidase verwendet. Hierfür wurde nach Protokoll ein Tropfen DAB Chromogen mit 1 ml DAB Substratpuffer gemischt und je 50ml des Gemischs auf die Schnitte aufgetragen. Die Streptavidin Peroxidase bildet innerhalb kürzester Zeit bei Vorhandensein von DAB ein braunes Endprodukt, daher wurde ab diesem Arbeitsschränk lichtgeschützt gearbeitet. Die Farbentwicklung wurde im Lichtmikroskop (Zeiss) überprüft und durch Spülen mit ddH<sub>2</sub>O-Wasser nach ca. 2' gestoppt.

Die Kernfärbung wurde im Anschluss mit Mayers Hämalaun (Sigma) durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte 2' mit Mayers Hämalaun inkubiert und anschließend unter fließendem kaltem Leitungswasser gebläut.

Zum Schluss wurden die gefärbten Präparate mit Aquatex (Sigma) eingedeckelt und zur Dokumentation abfotografiert.

#### 2.4.8.1 Gewebefixierung und Einbettung nach der HOPE-Methode

Die HOPE (Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect)-Technik ist eine neuartige Methode zur Herstellung von Gewebeschnitten. Im Vergleich zur reinen Paraffin-Fixierung bleiben beim HOPE-Verfahren sowohl Strukturproteine und Nukleinsäuren als auch Enzyme weitgehend in ihrem nativen Zustand erhalten. Aufgrund dessen ist das Tragen von Handschuhen bei allen Bearbeitungsschritten notwendig, da das HOPE-fixierte Gewebe auch aktive Viren, Prionen und Mikroorganismen enthalten kann. Zur Einbettung wurde das HOPE I - Kit (DCS) verwendet. Das Gewebe wurde wie bei der Cryo-Methode direkt nach dem Erhalt in die Tumorbank aufgenommen und weiterverarbeitet, indem es in Stücke einer Kantenlänge von max. 0,8 x 0,8 x 0,3 cm (LxBxH) geschnitten und sofort in ein acetonfestes 5 ml-Einmalröhrchen mit Schraubverschluss (DCS) mit eiskalter (0 – 4°C) HOPE-Lösung I gegeben wurde. Das Gewebe wurde dann für 40-64 Stunden bei 4°C inkubiert. Da das Hirngewebe besonders dicht gepackt ist, hat sich die lange Inkubationszeit von 64 Stunden als vorteilhaft herausgestellt. Es ist darauf zu achten, dass die Farbe der HOPE-Lösung I während der gesamten Fixierungsdauer orangegelb ist, was auf einen stabilen pH-Wert hinweist.

Nach der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit vollständig aus den Röhrchen entfernt, indem sie mit der Öffnung nach unten auf Filterpapier gestellt werden. Dann werden zur Dehydrierung je 5 ml einer eiskalten (0 – 4°C) Acetonlösung (HOPE-Lösung II und Aceton reinst 1 : 1000) in die Röhrchen gefüllt und für 2 Stunden bei 0 – 2°C inkubiert. Es ist sehr wichtig, dass das verwendete Aceton eine Temperatur von 2°C nicht überschreitet, da die Qualität der Fixierung und die spätere Schneidbarkeit der Paraffinblöcke davon abhängt. Deshalb wurde während der Dehydratation stets auf Eis gearbeitet. Anschließend wurden die Röhrchen wieder auf Filterpapier entleert und nur mit reinem eiskaltem Aceton befüllt und erneut 2 Stunden bei 0°C bis 2°C inkubiert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal mit einer Inkubationsdauer von 2 h wiederholt. Es war zu beachten, dass eine Dehydratisierungszeit von 8 Stunden nicht überschritten wurde.

Für die Paraffinierung wurden die Röhrchen entleert und sofort vorgewärmtes, flüssiges Paraffin (Low Melting Paraffin, DCS) unter Vermeidung von Luftblasen dazu gegeben. Dies muss sehr schnell erfolgen, da das Gewebe nicht austrocknen darf. Die Röhrchen werden nun bei 55°C bis 60°C über Nacht im Wärmeschränk gelagert. Dabei war zu beachten, dass entstandene Luftblasen entweichen. Am darauf folgenden Morgen wurde das Paraffin abgegossen und die Gewebestücke in eine Metallschale (55°C bis 60°C) eingebettet. Anschließend wurde zügig eine Gewebekassette (Cassette IV, Thermo Shandon) aufgesetzt und diese so lange, unter Vermeidung von Luftblasen, mit frischem, flüssigen Paraffin übergossen bis die Kassette gut bedeckt war. Diese Arbeit wurde im Wärmeschränk durchgeführt. Die Kassette wurde im Anschluss sofort auf Eis

geköhlt. In den frischen Blöcken können häufiger Risse entstehen, da es sich bei dieser Einbettung um reines Paraffin handelt. Nach dem Abkühlen wurde das Metallschälchen mit Hilfe einer Pinzette entfernt. Die Blöcke können nun bis zum Schneiden bei 4°C gelagert werden.

#### **2.4.8.2 Herstellung von Schnitten nach der HOPE-Fixierung**

Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica) hergestellt. Zu Beginn wurden die HOPE-fixierten Gewebelöcke für 30' bei -20°C tiefgeköhlt und ein Wasserbad mit einer Temperatur von 35 – 39°C, welches als Streckbad für die Schnitte diente, vorbereitet. Als Streckmedium wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet. Die geköhlt Gewebekassetten wurden im Mikrotom eingespannt, orientiert und das Messer so ausgerichtet, dass erste Schnitte angefertigt werden konnten. Das Gewebe besitzt nun üblicherweise eine Temperatur, bei der das Schneiden ohne Splitter möglich ist. Es wurden Schnitte einer Dicke von 8 mm angefertigt. Dann wurden sie mit Hilfe eines Pinsels auf die Oberfläche des 35 – 39°C warmen Wasserbads gelegt, ohne die Schnitte dabei einzutauchen. Dabei streckt sich der Schnitt, da die Strukturen im Gegensatz zu Formalin nicht miteinander vernetzt sind. Der ausgestreckte Schnitt wurde nun mit einem silanisierten Objektträger vorsichtig aufgenommen (zwei Schnitte/ Objektträger). Sobald die Schnitte glatt auf dem Objektträger lagen, wurden sie auf Filterpapier seitlich gut ablaufen lassen, um Wasserreste zwischen Schnitt und Objektträger zu entfernen und sofort in einen Glasständer (VWR) schräg stehend platziert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C im Wärmeschränk getrocknet. Die getrockneten Schnitte konnten auch über einen längeren Zeitraum im Kühltschrank bei 4°C für weitere Untersuchungen gelagert werden.

#### **2.4.8.3 Entparaffinierung und Rehydrierung HOPE-fixierter Schnitte**

Zum Entparaffinieren wurden 2 Glasküvetten (VWR) mit reinem Isopropanol (Sigma) befüllt und in einem Wärmeschränk auf 60°C erwärmt. Die Schnitte wurden in einer Glasschaukel nach Erreichen der Temperatur in der ersten Küvette 20' lang inkubiert, dann in die 2te überführt und in dieser weitere 10' inkubiert, um den Paraffinfilm vom Objektträger zu lösen. Die Objektträger wurden anschließend aus der Küvette genommen und auf Filterpapier abgetropft und luftgetrocknet. Es ist möglich, die getrockneten Schnitte so im Kühltschrank aufzubewahren, wobei zu beachten ist, diese luftdicht zu verpacken, da die Schnitte hygroskopisch sind. Für das Rehydratation der

Schnitte wurde 70%iges Aceton auf -20°C heruntergekühlt, und die Schnitte darin bei 4°C 10' inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger entnommen und auf Filterpapier ablaufen lassen und feucht in einer Küvette mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Objektträger in eine neue Küvette mit frischem ddH<sub>2</sub>O überführt und darin 10' bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger hochkant gestellt, kurz ablaufen lassen, das Wasser mit Filterpapier vorsichtig abgenommen und auf eine 45°C warme Heizplatte gelegt. Das Wasser war nach ca. 1 bis 2' verdunstet. Der Schnitt durfte jedoch nicht austrocknen.

#### **2.4.8.4 IHC-Färbung von HOPE-Schnitten nach der LSAB-Methode**

Die Schnitte wurden anhand des Protokolls des Dako-Kit (LSAB-Kit System HRP) gefärbt. Im Gegensatz zur Färbung der Cryoschnitte wurde die endogene Peroxidase mit Hilfe einer 0,5%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (in ddH<sub>2</sub>O) 10' bei RT geblockt. Die Folgeschritte entsprechen nun wieder dem unter 2.4.8 beschriebenen Protokoll. Zum Eindeckeln der Präparate wurde Entellan (Fa. Sigma-Aldrich) verwendet.

#### **2.4.8.5 Auswertung der immunhistochemischen Präparate**

Alle immunhistochemisch angefärbten Cryo- und HOPE-Schnitte wurden unter Beibehaltung der Einstellungen mit dem Lichtmikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss AG, Jena) untersucht. Es wurden mehrere Bereiche der angefärbten Schnitte mit der Axiocam Mrc5 Kamera (Carl Zeiss AG, Jena) fotografiert. Die Erhaltung der Struktur wurde ebenso beurteilt wie auch die Verteilung der Braun-Färbung (*hTNC-1* Nachweis) an den Schnitten.

### **2.5 Zellkultur eukaryontischer Zelllinien**

#### **2.5.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen und Techniken**

Alle Arbeiten an der Zellkultur wurden unter Reinraumbedingungen in einer Sicherheitssterilbank des Typs II (Herasafe) durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile, pyrogenfreie Materialien, Medien und Zusätze verwendet. Die hier verwendeten Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und mind. 90% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Binder) gezogen. Der Brutschrank wurde in regelmäßigen Abständen durch Hitzesterilisation gereinigt (3h/190°C).

### 2.5.2 Zellkulturmedien

Sämtliche Medien wurden Antibiotika frei verwendet. Sowohl die Myeloma-Zelllinie P3X63Ag.653 (*kurz*: Ag-8, Fa. ATCC/CRL 1580) als auch die Hybridoma Zellen benötigen stark puffernde Medien, wie das hier von der Fa. Biochrom verwendete und mit HEPES gepufferte RPMI 1640.

Die Myelomazellen wurden in mit HEPES gepuffertem RPMI 1640 mit Zusatz von 10% FCS-Gold (Fa. PAA) gezogen.

Das Normalmedium 1 (NM1) diente der Anzucht der Hybridoma direkt nach der HT-Adaptation. Es enthielt neben dem Zusatz von 10% FCS, ein konditioniertes Medium namens BriClone (Fa. Archport, Irland). Das BriClone ersetzte die sonst notwendigen Peritoneal Exudat Zellen (PEZ), die für das Wachsen der Hybridomas essentiell sind. Die gleichen Wachstumsfaktoren scheinen im BriClone enthalten zu sein. Hybridoma haben einen leicht erhöhten Bedarf an Glutamin, so dass die Medien entsprechend zusätzlich angereichert wurden.

Für die erste Produktion von Antikörpern und der Selektion wurde dieses vollständige NM1-Medium durch eines ersetzt, das nur noch 5% IgG-freies FCS enthält (NM2), das bedeutet unter 5 µg Rinder-IgG pro ml Kultivierungsmedium. So gelangten nur noch 0,22 µg Fremd-IgG/ml in das Medium, was die spätere Selektion erleichterte. Das BriClone wurde im NM2-Medium weggelassen. Dafür wurde zur besseren Produktion von Antikörpern 2-Mercaptoethanol (2-ME) 10 µM dem Medium zugesetzt. Das 2-ME reduziert das im FCS vorhandene Gluthathion und versorgt somit Hybridomas mit reduziertem Cystein. Wegen der Antikörper-Synthese haben Hybridomas einen erhöhten Bedarf an Cystein, da die vier Polypeptidketten durch zahlreiche Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Diese wiederum können nur entstehen, wenn an den richtigen Stellen in den Polypeptidketten Cysteine mit freier SH-Gruppen vorhanden sind.

Für die Produktion von Antikörpern im mg Maßstab wurden die Hybridomaklone, die sich in den *in vitro* Analysen, wie ELISA und Western Blot, als spezifisch für das eingesetzte Antigen erwiesen, an die Wachstumsbedingungen in Bioreaktoren adaptiert. Die Zellen wurden hierzu an serumfreies chemisch definiertes Medium stufenweise adaptiert.

In den Bioreaktoren sind Versorgungsmodul vom Produktionsmodul durch ein 12,5 kDa Dialysemembran getrennt. So werden die Zellen im Produktionsmodul in einem chemisch definierten Medium (hier SFM-Medium der Fa. Invitrogen) gezogen, welches von Polypeptiden und entsprechenden fremd-IgG's frei ist. Das Versorgungsmodul wurde mit einer dritten Zusammensetzung des NM befüllt. Dieses NM3-Medium enthält neben 10% FCS zusätzlich Glutamin, BriClone, Optimab (u.a. ein Insulin/Transferrin-Cocktail, der die Antikörperproduktion erhöht; Fa. Invitrogen)

und das 2-ME. An die Zellen gelangten nur niedermolekulare Proteine, kleine Wachstumsfaktoren, Mineralsalze, Glucose und Aminosäuren. Im Gegenzug ermöglichte die Membran die Abgabe von Abfallstoffen, wie dem schädlichen Laktat aus dem Produktionsmodul. Die Zellen waren also optimal versorgt, um hohe Zelldichten und Antikörperproduktionsraten zu erreichen.

### 2.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung benötigte man eine Neubauer Zählkammer, den Farbstoff Trypanblau 0.4%, der tote Zellen einer Kultur blau anfärbt, und natürlich ein inverses Lichtmikroskop. Die Neubauer Zählkammer und das Deckglas wurden mit 70% Ethanol gesäubert und die Ränder des geschliffenen Deckglases wurden vor dem Aufsetzen angefeuchtet. Das Deckglas wurde leicht hin- und herbewegt bis Newtonringe sichtbar wurden (Regenbogen-farbenes Muster). Diese zeigten an, dass das Deckglas richtig aufgelegt war und eine korrekte Zellzählung gewährleistet ist.

Von einer Zellsuspension bestehend aus 20 µl Zellen und 20 µl Trypanblau 0,4% wurde ein Aliquot durch Kapillarkräfte unter das Deckglas in die Kammer gezogen. Die Zellen wurden unterm Mikroskop gezählt und nach der Formel:

$$N \times B \times 10^4 = \text{vitale Zellen/ml}$$

die Zellzahl bestimmt, wobei N der Mittelwert der ungefärbten Zellen aus 4 ausgezählten großen Quadraten ist, B der Verdünnungsfaktor (durch Zugabe von Trypanblau) mal  $10^4$ .

Die Vitalität einer Zellkultur sollte nicht geringer als 90% sein. Weniger vitale Zellkulturen könnten Kontaminationen aufweisen. Solche Kulturen wurden eliminiert.

### 2.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen und Zelllinien wurden die Zellen zunächst bei 400 x g 5' lang sedimentiert. Der Überstand wurde gegebenenfalls für weitere Tests gewonnen. Die Zellzahl wurde bestimmt und  $10^7$  Zellen in 1 ml eiskaltem Einfriermedium (Medium mit Zusatz von 10% DMSO) resuspendiert. Die Kryoröhrchen werden in speziell isolierten Einfrierboxen bei  $-80^\circ\text{C}$  gestellt. In diesen Boxen wurde eine optimale Absenkung der Temperatur um  $1^\circ\text{C}$  pro Stunde erreicht. Für eine Konservierung der Klone über längere Zeit werden die Röhrchen nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff umgelagert.

Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen schnell im Wasserbad knapp über den Gefrierpunkt erwärmt und in 10 ml Medium aufgenommen, resuspendiert, bei 500 x g und 5' lang pelletiert und anschließend mit 5 ml Medium in eine

Zellkulturschale zur Inkubation bei 37°C/5% CO<sub>2</sub>/hohe Luftfeuchtigkeit gegeben. Nach 24 h setzten sich die Zellen. Nun wurde das noch DMSO-haltige Medium gegen frisches ausgetauscht.

### **2.5.5 Mycoplasmentest und DAPI-Färbung**

Mikroskopisch sichtbare Kontaminationen, sei es durch Bakterien verursachte oder gar der makroskopisch sichtbare Pilzbefall einer Zellkultur, wurden ohne weiteres erkannt und die entsprechend befallenen Zellkulturen eliminiert. Ein großes Problem stellen Kontaminationen mit Mycoplasmen dar. Dies sind 0,1 µm kleine Bakterien, die unterm Mikroskop nicht zu sehen sind. Zur Kontrolle auf versteckte Mycoplasmenkontamination wurde die DNA-Anfärbung mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI routinemäßig durchgeführt. Der Test wurde nach der Arbeitsanleitung des Herstellers durchgeführt. Eine nicht-kontaminierte Zellkultur zeigte nur nukleäre Fluoreszenz; Mycoplasmen-infizierte Kulturen zeigten dagegen zusätzlich einzelne fluoreszierende Punkte im Cytoplasma und manchmal auch im interzellulären Raum. In der Regel bemerkt man solche Kontamination bereits am verzögerten Wachstum einer Kultur.

### **2.5.6 Kultur der Myelomazellen P3X63Ag.653**

P3X63Ag.653 (ATCC-CRL-1580) ist eine in Suspension wachsende Myelomazelllinie. Sie wurde in mit HEPES gepuffertem RPMI 1640 mit Zusatz von 10 -15% FCS-Gold (Fa. PAA) gezogen. Alle 3 - 5 Tage erreichte die Kultur eine Zelldichte von 10<sup>7</sup> Zellen/ml und wurde in diesen Abständen auf eine Zellzahl von 10<sup>5</sup> Zellen/ml mit frischem Medium verdünnt.

### **2.5.7 Gewinnung der Milz-Zellen der immunisierten Mäuse**

Die Tiere wurden euthanasiert und mit 70%igem EtOH desinfiziert. Die Bauchdecke wurde zur Milzpräparation steril eröffnet. Die Milz wurde mittels einer sterilen Pinzette entnommen und in eine Petrischale mit eiskaltem, HEPES gepuffertem, FCS-freiem RPMI 1640 Medium gegeben. Die Milz wurde unter Reinraumbedingungen weiterverarbeitet. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde das entnommene Organ mit Hilfe eines sterilen Kolbens einer 1 ml Spritze durch ein steriles 100 µm Zellsieb gequetscht. Da insgesamt 4 Tiere immunisiert wurden und pro Fusion die B-Zellen einer Milz ausreichen, werden die restlichen Milzzellen in Einfriermedium kryokonserviert.



## 2.5.8 Immortalisierung der B-Zellen

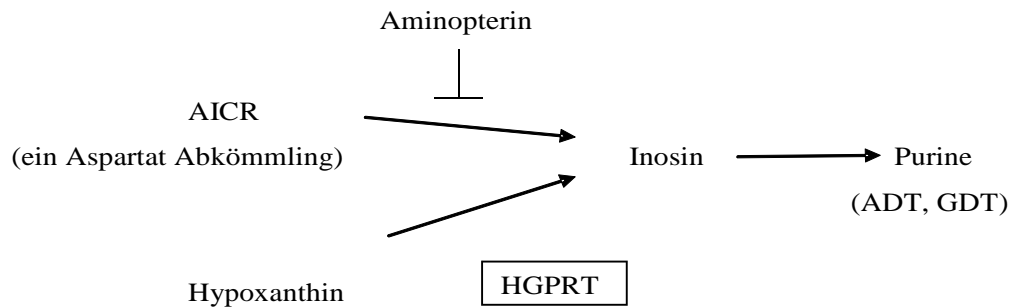
Die Hybridom-Technik bezeichnet ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern. Sie wurde 1975 von César Milstein und Georges Köhler entwickelt, wofür beide Forscher im Jahr 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten. Bei der Hybridom-Technik werden antikörperproduzierende Zellen (B-Zellen) mit Myelomzellen (Krebszellen) fusioniert, woraufhin quasi unsterbliche Hybride entstehen, die monoklonale Antikörper produzieren. Da B-Zellen eine limitierte Lebensdauer aufweisen, ist eine effiziente Kultivierung unter Laborbedingungen nicht möglich. Myelomzellen sind ihrerseits stark deregulierte Zellen, die nicht dem programmierten Zelltod (Apoptose) unterliegen. Durch die Fusion beider Zelltypen können ihre Eigenschaften in Form sogenannter Hybridomzellen kombiniert werden. Diese sind nun in der Lage, uneingeschränkt monoklonale Antikörper zu sezernieren. Durch diese Technik wurde es möglich, Antikörper in großen Mengen und mit maßgeschneiderter Spezifität herzustellen.

Das von Kennett (Kennett, 1979) entwickelte Fusionsprotokoll wurde in dieser Arbeit zur Herstellung einer hohen Rate immortalisierter Hybridomas verwendet:

Die B-Zellen eines immunisierten Tieres wurden 3 x mit FCS freiem HEPES gepuffertem RPMI 1640 gewaschen und in 10 ml des gleichen Mediums aufgenommen. Parallel zur B-Zellen Gewinnung wurden Myeloma-Zellen geerntet und gezählt, um sie anschließend mit den Milz-Zellen im Verhältnis 1 : 3 in einem Zentrifugenröhrchen zu kombinieren. Hier wurde die doppelte Menge Zellen benötigt, da die Zellen einer ganzen Milz immortalisiert werden sollen. Pro Milz wurden  $5 \times 10^7$  Myelom-Zellen ebenfalls 3 x mit FCS freiem HEPES gepuffertem RPMI 1640 gewaschen und in 15 ml des gleichen Mediums resuspendiert. Die Zellen wurden vereint und erneut bei  $400 \times g$  für 5' sedimentiert. Der ÜS wurde so vollständig wie nur möglich abgenommen und das Zellpellet mit der Pasteurpipette an der Röhrchen-Wand ausgebreitet. Bei RT wurde 0,6 ml PEG (vermittelt die Fusion) rasch zu den Zellen gegeben und diese 1' bei  $37^\circ\text{C}$  unter leichtem Klopfen im Wasserbad inkubiert. Es folgte eine 1' Inkubation der Zellen bei RT und die topfenweise Zugabe von 10 ml freiem HEPES gepufferten RPMI 1640 (über 5' hinweg); die Zellen wurden dabei ganz vorsichtig im Wasserbad geschwenkt (Zell-Zell-Fusionen sind in diesem Stadium höchst fragil und könnten wieder gelöst werden). Die so fusionierten Zellen werden nun für 10' auf Eis inkubiert und anschließend sedimentiert. Der ÜS muss erneut vollständig abgenommen werden, damit kaum mehr PEG an den Zellen verbleibt.

## 2.5.9 HAT-Selektion

Eukaryontische Zellen weisen zwei Purin-Synthesewege auf:



Myelomas weisen einen Gendefekt auf, infolge dessen sie keine funktionsfähige Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, kurz HGPRT, besitzen. Die Pyrimidin-De-Novo-Synthese aus Hypoxanthin funktioniert in Myelomas nicht. Der zweite Syntheseweg wurde durch das Aminopterin, eines der Bestandteile im HAT-Selektionsmedium, blockiert. Demzufolge überleben Myelomas die HAT-Selektion nicht. Ebenso gehen reine B-Zellen zu Grunde, weil sie eine eingeschränkte Lebensspanne von nur zwei Wochen besitzen. Nur Fusionsprodukte aus Myeloma- und B-Zellen überleben die HAT-Selektion (HAT steht für Aminopterin, Thymidin und Hypoxanthin).

Nach der Fusion wurden die Zellen in HAT-Selektionsmedium resuspendiert. Die eine Hälfte der Zellen wurde mit Methylcellulose-haltigem Medium versetzt und auf sterile Petrischalen ausgebracht. Dieses halb feste Medium besitzt den großen Vorteil, dass Zellen die HAT-Selektion überleben, sprich Klone auf dem Medium makroskopisch sichtbar werden und somit bereits als Einzelzellklon, ohne aufwendige Einzelzellklonierung, gewonnen werden können.

Die zweite Hälfte der Zellen wurde auf vier 24-Well-Platten verteilt und ebenfalls 14 Tage der HAT-Selektion ausgesetzt. Der Vorteil dieser Methode ist der, dass das HAT-Medium alle 2-3 Tage erneuert werden kann, was eine sicherere Selektion bietet.

Ist die Selektion abgeschlossen, werden die überlebenden Einzelzellklone von den Methylcellulose Platten jeweils in ein Loch einer 96-Loch-Platte ausgebracht und eine weitere Woche mit HT-haltigem Medium versorgt.

Die HAT-haltigen Zellkulturüberstände der Zellen der 24-Loch-Platte wurden mittels indirektem ELISA getestet. Positive Vertiefungen wurden im HT-Medium vereinzelt. Das HT-Medium enthält weiterhin das Hypoxanthin und das Thymidin. Diese beiden Bestandteile werden beibehalten, bis die Zellen ihren Hypoxanthin-unabhängigen-Purin-Syntheseweg wieder aktiviert haben.

### **2.5.10 Limiting-Dilution-Klonierung der Hybridoma**

Mit Hilfe der Limiting-Dilution-Klonierung (Klonierung durch limitierende Verdünnung) konnten aus Zellgemischen einzelne Zellen isoliert und einzelne Zellklone erzeugen werden (Goding, 1996). Zu diesem Zweck, wurden Verdünnungsreihen der nicht vereinzelter Zellsuspension hergestellt und auf 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Ziel ist es, nur eine Zelle pro Loch zum Wachstum zu bringen. Zu diesem Zweck wurde eine Zellzahl ausgesät, die statistisch zum Wachstum von nur einer Zelle pro Loch führt. Berücksichtigt man dabei Vitalität und Wachstumseigenschaften der Hybridomas liegt diese Zahl zwischen 4 und 1 Zelle je ml. Entsprechend werden je eine 96-Loch-Zellkulturplatte mit je 250  $\mu$ l/Loch der 4 Zellen/ml- und der 2 Zellen/ml-Verdünnung und zwei 96-Loch-Zellkulturplatten der 1 Zelle/ml-Verdünnung vorbereitet. Das Wachstum der Zellen wurde täglich überprüft und die Vertiefungen, die ein offensichtlich monoklonales Wachstum zeigten, markiert. Positive Klone wurden sowohl rekloniert als auch weiterkultiviert, bis Sicherheitsreserven eingefroren werden konnten. Die Zellkulturüberstände dieser Vertiefungen wurden zur der Selektion der Klone einer *in vitro* Analyse mittels ELISA unterzogen.

## **2.6 Tierexperimentelle Methoden**

### **2.6.1 Immunisierung von Balb/c Mäusen**

#### **2.6.1.1 Haltung der Balb/c Mäuse**

Für die Herstellung *muriner* monoklonaler Antikörper wurden weibliche 6 – 8 Wochen alte Mäuse des Inzuchtstammes BALB/cAnNCrl der Fa. Charles River in IVC-Käfigen unter Reinraumbedingungen gehalten. Die Versorgung bestand aus handelsüblichem Alleinfutter für Mäuse und Wasser. Beides wurde *ad libitum* verabreicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 6 Mäuse zur Herstellung monoklonaler Antikörper immunisiert. Die Immunisierung wurde als anzeigepflichtiger Tierversuch durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und entsprechend dokumentiert.

### 2.6.1.2 Immunisierung

Zur Immunisierung von Mäusen wurde das affinitätsgereinigte His<sub>6</sub>-tagged-Antigen (AG) verwendet. Zusätzlich wurde zum Verstärken der spezifischen Immunantwort das Antigen als Emulsion mit Freund's Adjuvans (FA) verabreicht. Die Grundimmunisierung erfolgte zusammen mit komplettem Freund'schen-Adjuvans (CFA). Das Immunisieren mit CFA fördert eine vermehrte TH1-Antwort. CFA besteht aus Mineralöl, hitzeinaktivierten *Mycobacterium tuberculosis* und einem Emulgator. Diese derart hergestellte Emulsion wurde - um einen maximalen Effekt zu erreichen - intraperitoneal injiziert. Die Boosts erfolgten mit inkomplettem Freund'schen-Adjuvans (IFA) (Sigma) - hier fehlen die Mycobakterien. Die letzte Booster-Injektion wurde genau drei Tage vor der Tötung der Mäuse und Gewinnung der Milzzellen appliziert. Dieser letzte Boost mit 400 µg AG und ohne FA sollte einem letzten Refinement (Reifung) der bis Dato verfügbaren B-Zellen und deren Antikörper dienen.

Das genaue Immunisierungsprotokoll lautete wie folgt:

BALB/cAnNCrI (weiblich / 6 – 8 weeks)	Maus 1 – 4 Immunisierte Gruppe	Maus 5 – 6 Kontrol-Gruppe
1 <sup>ste</sup> Immunisierung	75 µg AG in 50 µl PBS + 50 µl CFA	200 µl PBS
2 <sup>te</sup> Immunisierung (3 Wochen nach 1. Immunisierung)	75 µg AG in 50 µl PBS + 50 µl IFA	
3 <sup>te</sup> Immunisierung (6 Wochen nach 1. Immunisierung)		
4 <sup>te</sup> Immunisierung (9 Wochen nach 1. Immunisierung)		
5 <sup>te</sup> Immunisierung (12 Wochen nach 1. Immunisierung)	400 µg AG in 200 µl PBS	
Tötung: Zervikale Dislokation Tag 87 nach erster Immunisierung		

Die Injektionen erfolgten intraperitoneal (i.p.), der letzte Boost wurde i.v. verabreicht. Vor Beginn der Immunisierung und vor jedem Boost (am Tag der jeweiligen Immunisierung) wurden den Tieren aus der Augenvene venöses Blut zur Titerbestimmung entnommen.

### 2.6.1.3 Serumgewinnung aus Maus-Blut

Das aus der Augenvene mit heparinisierten Hämatokritröhrchen (Ø 0,8 mm) gewonnene Blut wurde 10' bei RT zur Gerinnung stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 3 000 x g zur besseren Absonderung des Serums von den zellulären Blutbestandteilen. Das so gewonnene Serum wurde aliquotiert und bei -20°C bis zur Durchführung der Titerbestimmung gelagert.

## 2.6.2 Pharmakokinetik der mAk und Fab-Fragmente

Als Teilgebiet der Pharmakologie beschreibt die Pharmakokinetik den zeitlich abhängigen Konzentrationsverlauf einer Verbindung/eines Pharmakons und dessen Verteilung und Umsetzung in einem Organismus und dessen Kompartimenten (Dost, 1968; Pelzer, 1981). Das Zusammenwirken der verschiedenen Zuflüsse und Abflüsse, die Umsetzung des Pharmakons nach verschiedenen Reaktionsordnungen und auch Wechselwirkungen wie die Rückkopplung, wirken sich auf den Verlauf der Konzentration eines Pharmakons in einem Organismus aus. Experimentell wurde der zeitliche Verlauf der Konzentrationsänderung  $dc/dt$  in Abhängigkeit von der applizierten Dosis  $D$  der zu testenden Verbindung ermittelt:

$$F(c, t, \dots) = dc/dt$$

Auf diese Weise können jedoch komplexe pharmakologische Prozesse, die bei der Umsetzung eines Pharmakons in einem lebenden Organismus stattfinden, welcher als ein offenes in einem ständigen Austausch von Materie und Energie (thermisches Fließgleichgewicht oder „steady state“) fern vom thermischen Gleichgewicht beschrieben werden kann, lediglich angenähert werden (Sernetz *et al.*, 1986)

In dieser Arbeit werden Größen wie Bioverfügbarkeit, mittlere Verweilzeit MTRT (Mean Total Residence Time) oder auch die systemische Clearance  $CL$  nicht bestimmt. Diese Größen könnte man durch Anwendung bestimmter pharmakokinetischer Modelle aus den hier bestimmten zeitlich abhängigen Konzentrationsverläufen im Tiermodell errechnen. In dieser Arbeit wurde die zeitabhängige Anreicherung und Ausscheidung des Antikörperradionuklids bestimmt. Die Bestimmung der Geschwindigkeit, mit welcher der in dieser Arbeit neu generierten monoklonalen Antikörper (mAk) und das rekombinante Fab-Fragment ihr Ziel am Tumor finden und deren Verweildauer am Tumor reichen aus, um die Bindeeigenschaften dieser Moleküle zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden die Antikörpermoleküle mit dem Radionuklid [ $^{123}\text{I}$ ]Iod markiert oder mit dem [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugiert und in einem Tiermodell die Biodistribution bestimmt.

### 2.6.2.1 Tiermodell und Tierhaltung

Die Biodistribution der in dieser Arbeit hergestellten monoklonalen, murinen Antikörper und der rekombinanten Fab-Fragmente wurde an mit U87-MG, einer *humanen* Gliomzelllinie, xenotransplantierten weiblichen SCID-Mäusen (CB17/IcrHsd-Prkdcscid/Crl-Albino) evaluiert.

Durch die Mutation auf dem Chromosom 16 erleiden SCID-Mäuse einen fast vollständigen Ausfall ihres Immunsystems. Entstanden ist dieser Mausstamm 1983 aus einer Spontanmutation auf dem congenen Stamm C.B 17 auf den Balb/c-Stamm über 17

Generationen. Da ein Teil der zellulären Abwehr fehlt, zeigen homozygote Tiere einen kombinierten Immundefekt (Bosma *et al.*, 1989), sie kennzeichnet ein Mangel an B- und T-Lymphozyten. Hämatopoetische Zellen wie Erythrozyten, Megakaryozyten, Mono- oder Granulozyten werden in diesen Tieren gebildet (Bosma *et al.*, 1988). Diese Immundefizienz ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Xenotransplantation *humaner* Tumore, da es sonst zu Abwehrreaktionen des Empfängertiers kommen kann (Knox *et al.*, 1992).

### **2.6.2.2 Tumormodell**

Die Xenotransplantation erfolgte entweder durch subkutane Injektion von  $6 \times 10^6$ -Zellen in PBS der U87-MG-Gliomzelllinie oder durch subkutane Injektion von 0,1 ml eines homogenisierten U87-MG-Tumors in PBS. Die Tumorzellen wurden in Isoflurannarkose (1,6 Vol.-% Isoflurane, 1,2 Vol.-% O<sub>2</sub>) an die rechte Flanke der SCID-Mäuse xenotransplantiert. Innerhalb von 21 Tagen wuchsen solide Tumore mit einem mittleren Durchmesser von 5-7 mm an. Dies entsprach einem Gewicht von ca. 0,5 bis 1 g an Tumorgewebe. Da sich der Tumortake massiv bei Tumoren, die eine Größe von 1,5 g übersteigen, verschlechterte (Hagan *et al.*, 1986), wurde drauf geachtet, dass die erzeugten Tumore idealerweise eine Größe von 0,5 bis 1 g Gewicht nicht überschreiten.

### **2.6.2.3 Tierhaltung, Anästhesie, Abbruchkriterien und Euthanasie**

Die Tiere wurden, weil immundefizient, in sterilen IVC-Einheiten gehalten und in der Sterilwerkbank umgesetzt.

Sämtliche Handlungen am Tier wurden entsprechend der behördlichen Auflage in Isoflurannarkose (1,6 Vol.-% Isoflurane, 1,2 Vol.-% O<sub>2</sub>) durchgeführt. Die Narkosedauer beträgt bei der Tumorimplantation ca. 5'. Die Bildgebung dauerte in der Regel 1 h; die Tiere wurden zu diesem Zweck ebenfalls mit Isofluran narkotisiert, für die Dauer des Scann's warmgehalten und die Augen mit Bepanthensalbe versorgt (zum Schutze vor Austrocknung). Anschließend wurden die Tiere bis zum Erwachen aus der Narkose warmgehalten.

Tiere wurden aus dem Versuch genommen, wenn sie einen Gewichtsverlust von mehr als 15% erlitten. Traten die im Folgenden genannten parametrischen Abbruchkriterien auf, wurden die Tiere entsprechend tierärztlich untersucht, um gemeinsam über das weitere Vorgehen (Abbruch, Änderung des Analgesieregimes, spezielle Pflegemaßnahmen, engmaschigere Überwachung, etc...) zu entscheiden.

Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation zum Versuchsende oder bei Eintritt der Abbruchkriterien.

#### **2.6.2.4 Studien zur Biodistribution Radionuklid-markierter Antikörper und Antikörperfragmente**

Tumor tragende weibliche SCID-Mäuse wurden zur i.v. Injektion des radiomarkierten Immunkonjugates mit Isofluran narkotisiert und warmgehalten. In eine der lateralen Schwanzvenen wurden für die Biodistribution 2,5 MBq des Tracers (entsprechend ca. 5 µg [<sup>123</sup>I]Iod- oder [<sup>111</sup>In]In-DTPA-konjugierter mAk) oder 0,5 MBq [<sup>111</sup>In]In-DTPA-konjugiertes Fab-Fragment über eine Verweilkanüle injiziert und mit 0,1 ml 0,9 % NaCl nachgespült. Das Applikationsvolumen durfte dabei 0,2 ml nicht übersteigen. Gruppen von jeweils 6 Tiere wurden zu definierten Zeitpunkten nach Tracer-Gabe euthanasiert: 2 h, 24 h, 48 h, 72 h post Injektion. Im Anschluss daran wurden verschiedene Organproben entnommen: Tumor, Muskel, Blut, Herz, Nieren, Schilddrüse, Darm (Ingesta durch Ausstreichen entfernt), Magen (Ingesta durch Ausstreichen entfernt) und Milz. Zur Bestimmung der angereicherten Radioaktivität wurden die Organe in davor gewogene Gamma-Counter Probenröhrchen überführt, das Gewicht bestimmt und die Impulsraten an den Organproben (Count per Minute, cpm) über 1' lang gemessen und zerfallskorrigiert. Zusätzlich wurden jeweils 3 Standardproben mitgemessen, die 1% der Applikationsaktivität enthielten. Für die Pharmakokinetik wurde der zeitliche Verlauf der Konzentrationsänderung der Applikationsaktivität  $dc/dt$  in Abhängigkeit von der applizierten Dosis  $D$  ermittelt und in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe/Blut umgerechnet (%ID/g). Die so ermittelten Werte wurden pro Gruppe statistisch folgendermaßen ausgewertet: es wurde das Arithmetische Mittel aller Tiere einer Gruppe und die Standardabweichung bestimmt. Die Ergebnisse wurden graphisch in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Zusätzlich wurden die Tumor/Nicht-Tumor-Verhältnisse berechnet und graphisch dargestellt. Um eine übermäßige Anreicherung an freiem Iodid in der Schilddrüse zu minimieren, bekamen die Mäuse 1 Tag vor Tracer-Injektion und bis zum Versuchsende Irenat (0,1mg/ml) über das Trinkwasser verabreicht.

#### **2.6.2.5 Szintigraphie**

Pro Gruppe und Antikörper bzw. Fab-Fragment wurde beispielhaft ein Tier szintigraphisch untersucht. Diese Bilder dienen der Visualisierung der Verteilung der Radionuklid-Konjugate im Tier und sind aufgrund der verwendeten Aufnahme-Technik nur semi-quantitativ. Die Tiergruppen, die das Iod-Immunkonjugat verabreicht bekamen, wurden wie unter 2.6.2.4 beschrieben mit Irenat zur Schilddrüsenblockade vorbehandelt. In Isoflurannarkose wurden ca. 25 MBq Tracer (entsprechend ca. 50 µg

Antikörper) i.v. injiziert. Für den mAk wurden die Tiere wiederholt zu folgenden Zeitpunkten untersucht: 2 h, 24 h, 48 h und 72 h p.i. Für die Pharmakokinetik des Fab-Fragmentes wurden die Tiere zu folgenden Zeitpunkten szintigraphisch untersucht: 1 h, 6 h und 24 h p.i.

#### **2.6.2.6 Radioiodmarkierung der Antikörper**

Als diagnostisches Nuklid wurde [ $^{123}\text{I}$ ]Iod für die Bestimmung der Pharmakokinetik der in dieser Arbeit generierten monoklonalen *murinen* Antikörper und deren rekombinant hergestellten Fab-Fragmente verwendet. Dieses hat eine HWZ von 13 Stunden, ist ein reiner  $\gamma$ -Strahler mit einer Energie von 159 keV und kann verhältnismäßig einfach über nukleophile Substitution an Proteine gekoppelt werden.

Die Markierung der mAk (0,5 mg/Ansatz) mit Radioaktivitätsmengen von 100-120 MBq wurde nach einer von Fraker und Speck (Fraker und Speck, 1978) entwickelten, modifizierten und vereinfachten Iodogen-Methode durchgeführt, wie sie von Weadock und Mitarbeitern (Weadock *et al.*, 1990) beschrieben wurde. Die Reaktion wurde in mit 500  $\mu\text{g}$  Iodogen beschichteten Reaktionsfläschchen (1,3,4,6-Tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycoluril, IodoGen, Pierce Chem., Rotterdam) in Phosphat-Puffer (0.05 M, pH 7.4) durchgeführt, wobei eine Reaktionszeit von fünf bis zehn Minuten ausreichend war. Trägerfreies [ $^{123}\text{I}$ ]Iod wurde als NaI in 0.05 M NaOH (7.4 GBq/ml,  $\sim 740$  MBq/ $\mu\text{g}$ ) eingesetzt und von GE Healthcare (Ismaning, Deutschland) bezogen. Nicht protein-gebundenes Iodid wurde mittels eines Anionen-Austauschers (Dowex 1X8-100, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) innerhalb von 3-5 Minuten entfernt. Anschließend wurde die Lösung über einen Sterilfilter gereinigt (Acrodisc HT Tuffryn low protein binding, 0.2  $\mu\text{m}$ , Gelman Sciences, Ann Arbor, USA). Die Markierungsausbeuten wurden nach der Reinigung durch Bestimmung der radiochemischen Reinheit ermittelt. Die Integrität der Präparationen wurde mittels Gelfiltrationschromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC), Dünnschichtchromatographie an Kieselgel beschichteten Material und Proteinfällung mit Trichloressigsäure bestimmt.

#### **2.6.2.7 Indium-DTPA-Konjugation der Immunglobulin Ketten**

##### **Kopplung des SCN-benzyl-DTPA an den Antikörper**

500  $\mu\text{g}$  mAk ( $3,33 \times 10^{-9}$  mol) oder 250  $\mu\text{g}$  Fab ( $5 \times 10^{-9}$  mol) wurden gegen 0,2 M Ammoniumacetatpuffer, pH 9,0 dialysiert. In einem sterilen 5 ml Glasfläschchen wurde SCN-benzyl-DTPA (MW: 649,9 g) in einem 30 fachen molaren Überschuss zum Immunglobulin gegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde gegen 0,25 M Ammoniumacetatpuffer, pH 5,5 und anschließend gegen 0,25 M NaAc, pH 7,5



mittels Vivaspin Konzentratoren-Röhrchen (30 kDa MWCO für die mAk und 3 kDa MWCO für das Fab-Fragment) dialysiert. Bei dieser Dialyse konnte auch freies SCN-benzyl-DTPA entfernt werden.

#### **[<sup>111</sup>In]Indium-Markierung der DTPA-derivatisierten Antikörpermoleküle**

Der zuvor mit DTPA derivatisierte mAk bzw. Fab wurde in Ammoniumacetatpuffer, pH 7,5 mit 100-200 MBq Indiumchlorid versetzt und für 2 h bei 42°C inkubiert. Freies [<sup>111</sup>In]Indium wurde über eine NAP-5 Säule entfernt und die Qualitätskontrolle mittels DC und HPLC durchgeführt.

#### **2.6.2.8 Bedingungen für die Dünnschichtchromatographie**

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde nach der „Instant Thin-Layer-Chromatography“ Methode auf Silica-Gel beschichteten DC-Platten durchgeführt. (ITLC-SG, Pall Corp., Ann Arbor, USA)). Nachdem die Proben in der Entwicklungskammer mit dem Laufmittel 0,9% NaCl aufgetrennt wurden, dampfte man das Laufmittel von der DC-Platte ab. Ausgewertet wurden die Chromatogramme am Radiodetektor MiniGITA der Fa. Raytest. Der anschließend bestimmte Retentionsfaktor ( $R_f$ -Wert) ist für jede Verbindung charakteristisch, aber vom chromatographischen System abhängig. Er lässt also eine qualitative Auswertung des Chromatogramms zu (gilt aber nicht als Beweis für eine Identifizierung). Der  $R_f$ -Wert ergibt sich als Quotient aus Laufstrecke der Substanz zur Laufstrecke des Fließmittels vom Startpunkt aus.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Rekombinante Antigen-Herstellung in *E. coli*

#### 3.1.1 Sequenzanalysen und Nachweis der tumorassoziierten Isoform des *humanen* Tenascin C

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Sequenzunterschiede der sechs *hTNC* Spleißisoformen aus dem alternativen Spleißen der 7 FNIII-Domänen: A1 – A4, B, AD1, AD2 resultieren. In dieser Arbeit wurden mittels Rechner gestützten Analysen der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der *hTNC* Spleißisoformen (Software: ClustalW; Larkin *et al.*, 2007) identische, ähnliche oder auch unterschiedliche Bereiche identifiziert (Abb. 3.1). Es zeigte sich dabei, dass die *hTNC* Spleißisoformen eine maximal 95%ige Homologie in der Aminosäuresequenz zueinander aufweisen, wobei alle homologen Bereiche eine 100% identische DNA- und Aminosäuresequenz haben (Abb. 3.1). Die Sequenzunterschiede kommen durch die alternativ gespleißten FNIII Domänen zustande. Die Aminosäuresequenz der *hTNC*-1 (Isoform 1) ist mit 2201 Aminosäuren die längste und dient für die weiteren Analysen als Konsensussequenz (Acc.nr.: P24821-1; cDNA: NM\_002160).

Tabelle 3.1: Übersicht der *hTNC* Isoformen und der durch alternatives Spleißen während der RNA Prozessierung entfernte FNIII-Domänen A1 bis AD2 (entsprechend FNIII6 - 9)

<i>Isoform</i>	FNIII-A1	FNIII-A2	FNIII-A3	FNIII-A4	FNIII-B	FNIII-AD1	FNIII-AD2
<i>hTNC</i> -1	+	+	+	+	+	+	+
<i>hTNC</i> -2	-	-	-	-	+	-	+
<i>hTNC</i> -3	-	-	-	-	+	+	+
<i>hTNC</i> -4	+	+	+	+	+	-	+
<i>hTNC</i> -5	-	-	-	-	-	-	+
<i>hTNC</i> -6	-	-	-	-	-	-	-

Des weiteren zeigten die Sequenzanalysen, dass in der Isoform 4 lediglich die ca. 90 Aminosäuren umfassende FNIII-Domäne 11 (Exon AD1) alternativ gespleißt wird (Tab. 3.1). In den weiteren Isoformen werden 4 bis 7 FNIII-Domänen durch alternatives Spleißen während der RNA Prozessierung entfernt (Tab. 3.1). Es konnte jedoch keine der FNIII Domänen gefunden werden, die nur in der Isoform 1 vorkommt und in den Isoformen 2 bis 6 alternativ gespleißt wird, um einen alleinigen Nachweis der Isoform 1 führen zu können. Den Isoformen 2, 3, 5, 6 fehlen die Exons A1 bis A4 (entsprechen den FNIII-Domänen 6 bis 9). Den Isoformen 2, 4, 5, 6 fehlt das AD1 Exon (entspricht der FNIII-Domänen 11). Die cDNA's aller weiteren *humanen* Tenascin Formen: TNX, TNC, TNR, TNW kodieren ebenfalls nicht für FNIII-A3 und FNIII-AD1.

Daher wurden für den semiquantitativen Nachweis der Expression des *hTNC-1*, der tumorspezifischen Isoform, genspezifische Primer für die Amplifikation der AD1-Domäne von cDNA entwickelt. Das Primerpaar überspannt die AD1-Domäne und bindet jeweils ein Exon vor bzw. nach der zu amplifizierenden Domäne. Durch den nichtkodierenden DNA-Abschnitt (Intron), der zwischen den Exons liegt, wurde gewährleistet, dass keine Amplifikation von genomischer DNA stattfindet. Der Primer 5'-NM\_002160(4752-4773) bindet im Exon FNIII-B und amplifiziert mit dem Gegenstrangprimer 3'-NM\_002160(5350-5329), der im Exon FNIII-AD2 bindet, ein ca. 600 bp langes Produkt (die FNIII-AD1 Domäne). Werden die Isoformen 2 und 4 ebenfalls exprimiert, wurde ein zweites ca. 330 bp langes PCR-Produkt ebenfalls amplifiziert.

Die Domäne FNIII-A3 wurde in den Isoformen 2, 3, 4 und 5 alternativ gespleißt und kann ebenfalls zum Nachweis der *hTNC-1* dienen. Diese Domäne wurde aufgrund dessen als Antigen für die Antikörperherstellung verwendet (Abb. 3.1).

Es wurde Gesamt-RNA (gRNA) von allen in Tabelle 3.2 aufgeführten Biopsaten hergestellt (2.1.1), revers transkribiert (2.1.3) und anschließend dreifach Ansätze für die PCR angesetzt (2.1.4). Die Positivkontrolle der PCR mit dem ubiquitär im menschlichen Körper exprimierten  $\beta$ -Aktin zeigte mit allen von gRNA hergestellten cDNA's ein 564 bp langes Produkt. Alle cDNA's waren frei von genomischer DNA Kontamination.

P24821-2	YGI GVS AVKEDKESNPATINAATELDTPKDLQVSETAETSLLTLWKTPAKFDYRLNYS LPTIGQWVGVLPRNITTSYVL	1040
P24821-4	YGI GVS AVKEDKESNPATINAATELDTPKDLQVSETAETSLLTLWKTPAKFDYRLNYS LPTIGQWVGVLPRNITTSYVL	1040
P24821-6	YGI GVS AVKEDKESNPATINAATELDTPKDLQVSETAETSLLTLWKTPAKFDYRLNYS LPTIGQWVGVLPRNITTSYVL	1040
P24821	YGI GVS AVKEDKESNPATINAATELDTPKDLQVSETAETSLLTLWKTPAKFDYRLNYS LPTIGQWVGVLPRNITTSYVL	1040
P24821-3	YGI GVS AVKEDKESNPATINAATELDTPKDLQVSETAETSLLTLWKTPAKFDYRLNYS LPTIGQWVGVLPRNITTSYVL	1040
P24821-5	YGI GVS AVKEDKESNPATINAATELDTPKDLQVSETAETSLLTLWKTPAKFDYRLNYS LPTIGQWVGVLPRNITTSYVL	1040
	*****	
P24821-2	RGLEPGQEYNVLLTA EKGRHKSKPARVKAS-----	1070
P24821-4	RGLEPGQEYNVLLTA EKGRHKSKPARVKASTEQAPELENLIVTEVGM DGLRLNWTAA DQAYEHFIIQVQEANKVEAARNL	1120
P24821-6	RGLEPGQEYNVLLTA EKGRHKSKPARVKAS-----	1070
P24821	RGLEPGQEYNVLLTA EKGRHKSKPARVKASTEQAPELENLIVTEVGM DGLRLNWTAA DQAYEHFIIQVQEANKVEAARNL	1120
P24821-3	RGLEPGQEYNVLLTA EKGRHKSKPARVKAS-----	1070
P24821-5	RGLEPGQEYNVLLTA EKGRHKSKPARVKAS-----	1070
	*****	
P24821-2	-----	1070
P24821-4	TVPGSLRAVDIPGLKAATPYTVSYGVIQGYRTPVLSAEASTGETPNLGEVWVAEVGWDALKLNWTAP EGAYEYFFIQVQ	1200
P24821-6	-----	1070
P24821	TVPGSLRAVDIPGLKAATPYTVSYGVIQGYRTPVLSAEASTGETPNLGEVWVAEVGWDALKLNWTAP EGAYEYFFIQVQ	1200
P24821-3	-----	1070
P24821-5	-----	1070
	-----	
P24821-2	-----	1070
P24821-4	EADIVEAAQNLI TVPGLRSTIDLPLGLKAATHYTTITRGVITQDFSTIPLSVEVLITEEVPDMGNLIVTEVSWDALRLNWTIPD	1280
P24821-6	-----	1070
P24821	EADIVEAAQNLI TVPGLRSTIDLPLGLKAATHYTTITRGVITQDFSTIPLSVEVLITEEVPDMGNLIVTEVSWDALRLNWTIPD	1280
P24821-3	-----	1070
P24821-5	-----	1070
	-----	
P24821-2	-----	1070
P24821-4	GIYDQFTIQVQ EADQVEEAHNLIVPGSLRSMETPGLRAGITPYTVITLHGEVRGHSIRPLAVEVWTE DLPQLGDLAVSEVGN	1360
P24821-6	-----	1070
P24821	GIYDQFTIQVQ EADQVEEAHNLIVPGSLRSMETPGLRAGITPYTVITLHGEVRGHSIRPLAVEVWTE DLPQLGDLAVSEVGN	1360
P24821-3	-----	1070
P24821-5	-----	1070
	-----	
P24821-2	-----TAKEPE	1076
P24821-4	DGLRLNWTAA DNAYEHFVIQVQEVNKVEAAQNLI TVPGSLRAVDIPGLEAATPYRVSYGVI RGYRTPVLSAEASTAKEPE	1440
P24821-6	-----	1070
P24821	DGLRLNWTAA DNAYEHFVIQVQEVNKVEAAQNLI TVPGSLRAVDIPGLEAATPYRVSYGVI RGYRTPVLSAEASTAKEPE	1440
P24821-3	-----TAKEPE	1076
P24821-5	-----	1070
	-----	
P24821-2	IGNLNVS DITPESFNLSWMAIDGIFETFTTIEIIDS NRLL EIVEYNLSGAERTAHISGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRIKTI	1136
P24821-4	IGNLNVS DITPESFNLSWMAIDGIFETFTTIEIIDS NRLL EIVEYNLSGAERTAHISGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRIKTI	1520
P24821-6	-----	1070
P24821	IGNLNVS DITPESFNLSWMAIDGIFETFTTIEIIDS NRLL EIVEYNLSGAERTAHISGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRIKTI	1520
P24821-3	IGNLNVS DITPESFNLSWMAIDGIFETFTTIEIIDS NRLL EIVEYNLSGAERTAHISGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRIKTI	1156
P24821-5	-----	1070
	-----	
P24821-2	SATAT-----	1161
P24821-4	SATAT-----	1525
P24821-6	-----	1070
P24821	SATATTEALPLLENLITISDINPYGFTVSWMASENAFDSFLVTVVDSGKLLDQEFITLSGTQRKLELRGLITIGIGYEVWVS	1600
P24821-3	SATATTEALPLLENLITISDINPYGFTVSWMASENAFDSFLVTVVDSGKLLDQEFITLSGTQRKLELRGLITIGIGYEVWVS	1236
P24821-5	-----	1070
	-----	
P24821-2	-----TEAEPEVDNLLVSDATPDGFRLSWTADEGVFDNFVLKIRDITKKQSEPLEITTLAPERTRDITGL	1225
P24821-4	-----TEAEPEVDNLLVSDATPDGFRLSWTADEGVFDNFVLKIRDITKKQSEPLEITTLAPERTRDITGL	1529
P24821-6	-----	1070
P24821	GFTQGHQTKPLRAEIVTEAEPEVDNLLVSDATPDGFRLSWTADEGVFDNFVLKIRDITKKQSEPLEITTLAPERTRDITGL	1680
P24821-3	GFTQGHQTKPLRAEIVTEAEPEVDNLLVSDATPDGFRLSWTADEGVFDNFVLKIRDITKKQSEPLEITTLAPERTRDITGL	1316
P24821-5	-----TEAEPEVDNLLVSDATPDGFRLSWTADEGVFDNFVLKIRDITKKQSEPLEITTLAPERTRDITGL	1134
	-----	
P24821-2	REATEYEIELYGISKGRRSQIVSAIATTAMGSPKEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESF	1285
P24821-4	REATEYEIELYGISKGRRSQIVSAIATTAMGSPKEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESF	1649
P24821-6	-----TAMGSPKEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESF	1103
P24821	REATEYEIELYGISKGRRSQIVSAIATTAMGSPKEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESF	1740
P24821-3	REATEYEIELYGISKGRRSQIVSAIATTAMGSPKEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESF	1376
P24821-5	REATEYEIELYGISKGRRSQIVSAIATTAMGSPKEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESF	1194
	*****	

Abbildung 3.1: Ausschnitt (960aa–1740aa/Gesamtlänge hTNC-1: 2201aa) einer Aminosäure Sequenzanalyse (Alignment) der hTNC (P24821) Isoformen: Die Sequenzhomologie beträgt 95%, wobei die homologen Bereiche eine 100% identische Aminosäuresequenz aufweisen; A3-Exon (rot) und AD1-Exons (grün); P24821-1 bezeichnet die hTNC-1, usw. (Software: ClustalW2: Larkin et al., 2007)

Tabelle 3.2: Getestete humane Biopsate: PCR mit genspezifischen Primern für die Amplifikation der FNIII-AD1 Domäne

Biopsat	Anzahl	Isoform 1 und 3	Isoform 2 und 4
<b>NH</b>	6	negativ	negativ
<b>Epilepsie-NH</b>	4	2 x positiv 2 x negativ	4x schwach positiv
<b>Trauma-NH</b>	1	positiv	negativ
<b>Gliom °II</b>	6	3 x positiv 3 x negativ	1 x negativ 5 x schwach positiv
<b>Gliom °III</b>	7	7 x positiv	6 x schwach positiv 1 x positiv
<b>Gliom °IV - GBM</b>	25	25 x positiv	15 x stark positiv 10 x schwach positiv

Gesundes bzw. Tumor freies Hirngewebe (NH) wurde meist während der neurochirurgischen Entfernung von Epilepsiefoci gewonnen (Klinik für Neurochirurgie/LMU). Es kann somit nicht immer bestimmt werden, ob es sich bei den vorliegenden Biopsaten um gesundes Hirngewebe handelt. So wurden auch in 50% der Epilepsiebiopsate *hTNC-1* bzw. -3 nachgewiesen. Die weiteren NH-Biopsate, die bei der operativen Entfernung von Gliomen gewonnen wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit durchweg als negativ für die Isoform 1 jedoch in zwei Fällen positiv für die Isoformen 2 und 4 getestet (Tab. 3.2), was ein Hinweis auf Wundheilungsprozesse sein könnte (siehe auch 1.3).

Nach WHO als °II diagnostizierte Gliome zeigten in drei Fällen ebenfalls keine *hTNC-1* Expression. In drei weiteren hier getesteten Biopsaten konnte die Isoform 1 detektiert werden allerdings deutlich schwächer als in WHO°IV-Biopsaten.

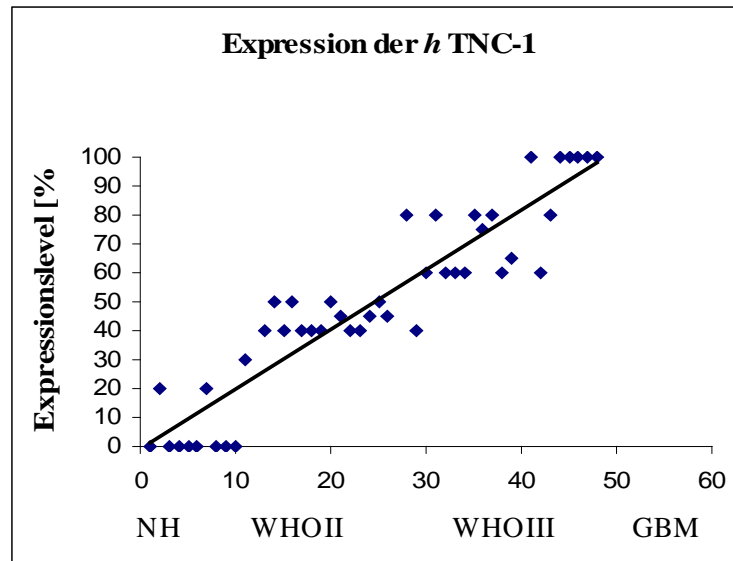


Abbildung 3.2: Semiquantitative PCR-Daten: Expression der FNIII-AD1 Domäne in gesunden Hirnbiopsaten und Gliomen: die Expression korreliert mit dem Malignitätsgrad und tritt ebenfalls im Rahmen der Wundheilung (nach Traumata, Epilepsie) in gesunden Hirnarealen auf

Gliombiopsate von WHO°III und °IV Tumoren verhalten sich diesbezüglich sehr ähnlich. Es wurden durchwegs in allen Biopsaten sowohl die Isoform 1 und 3 und ebenso die Isoformen 2 und 4 nachgewiesen.

Die in der Abb. 3.2 dargestellte graphische Auswertung der hier erhobenen semi-quantitativen PCR-Daten zeigten einen klaren Trend der Zunahme der Expression der *hTNC-1* Isoform mit dem Malignitätsgrad und das Fehlen dieser in gesunden Gehirnbiosaten. Es wurden alle untersuchten NH-Proben und die Gliome anhand ihrer WHO-Klassifizierung gruppiert und graphisch in Abb. 3.2 dargestellt. Die lineare Regressionsgerade zeigt einen Aufwärtstrend von NH-Proben (niedrigste Expressionsrate) bis hin zur Gruppe der WHO°IV-Gliome mit dem höchsten Nachweis der FNIII-A3 Domäne des *hTNC-1*.

### 3.1.2 Auswahl und Nachweis eines geeigneten Antigens für die Herstellung mAk gegen das hTNC-1

Für die gentechnische Herstellung eines für die Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper geeigneten Antigens wurde die FNIII-A3-Domäne im *hTNC-1* Gen verwendet, die in den anderen Tenascinen fehlt bzw. nur in der Isoform 4 exprimiert wurde, diese aber nicht in NH nachgewiesen werden konnte. Der monoklonale Antikörper soll in Maus hergestellt werden.





Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der Aminosäuresequenzen der *hTNC* verglichen mit den *mTNC* von ca. 87% (Abb. 3.3) kann kein Bereich gefunden werden, der eine erfolgreiche Immunisierung verspricht, da keine größeren Unterschieden in der Aminosäuresequenz vorhanden sind. Allen bekannten murinen Tenascinen fehlt die FNIII-A3-Domäne (Abb. 3.4).

Mit der im Rahmen dieser Arbeit (3.1.1) untersuchten Domäne AD1 würde keine erfolgreiche Immunisierungen in Maus erwartet werden, da diese auch in den *mTNC* Isoformen vorkommt.

Mit der FNIII-A3-Domäne, die allen *mTNC* fehlt, wären die Erfolgsaussichten für die Immunisierung in Maus gegen das *hTNC*-1 höher (Abb. 3.4).

Rechner basierte Sequenzanalysen der Aminosäuresequenz der FNIII-A3 Domäne sollten die Immunogenizität dieses Abschnittes des *hTNC*-1 abschätzen. Die Software „Protean“ des Softwarepaketes DNASTAR rechnete mit Hilfe des Emini-Algorithmus/Emini-Plot (Emini, *et al.*, 1985) die Wahrscheinlichkeit bestimmter Aminosäurefolgen im gefalteten Polypeptid an der Oberfläche positioniert zu werden. Diese Bereiche sind für das Immunsystem von Vertebraten besser exponierte Abschnitte im Antigen, die geeignete Epitope anbieten. Epitope, die als MHC-Motive für das Immunsystem von Vertebraten darstellen könnten, rechnet der Sette-Algorithmus (Sette, *et al.*, 1989). Die Epitope R94-T100 und E106-T112 werden mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Oberfläche im gefalteten Polypeptid positioniert und werden vom Sette-Algorithmus zusätzlich als mögliche MHC-Motive bestätigt (Abb. 3.5).

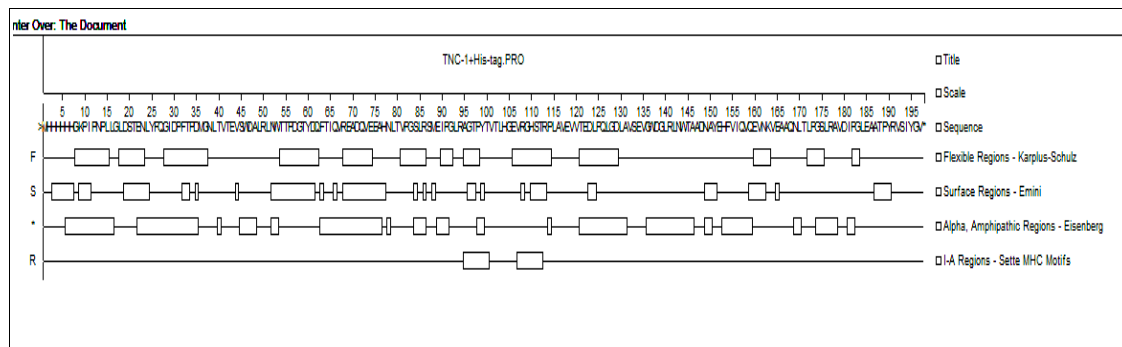


Abbildung 3.5: Analyse und Berechnung des Antigenizitätsindex geeigneter Epitope der FNIII-Domäne A3 (His-tagged-hTNC1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>)). Mit verschiedenen Algorithmen werden hydrophile Epitope mit hoher sterischer Flexibilität oder auch MHC-Motive errechnet (Sette *et al.*, 1989; Emini *et al.*, 1985). Software: DNASTAR/Protean.

Einen guten Antigenizitätsindex für die Domäne FNIII-A3 zeigte auch der relativ hohe Anteil der Aminosäuren Prolin und Tryptophan (insgesamt 10%) auf. Diese beiden Aminosäuren werden als sogenannte Helixbrecher bezeichnet, weil sie die Ausbildung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Blättern verhindern bzw. in der Aminosäuresequenz in Bereichen ( $\beta$ -Turns) zwischen  $\alpha$ -Helices und/oder  $\beta$ -Blättern zu stehen kommen.  $\beta$ -Turns haben einen hohen Antigenizitätsindex. Glycin wiederum (8,12%) ist die kleinste Aminosäure und ermöglicht eine hohe sterische Flexibilität im Protein und somit die Ausbildung von aliphatischen  $\alpha$ -Helices (Abb.3.5 und 3.6), die ebenfalls positiv zum Flexibilizitäts- und somit zum Antigenizitätsindex dieses Antigens beitragen (Eisenberg, *et al.*, 1982). Die Aminosäure Cystein kommt in der FNIII-Domäne A3 (His-tagged-*hTNC1*(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>)) nicht vor (Abb. 3.6). Cystein ist an der Bildung von  $\beta$ -Blättern beteiligt. Da  $\beta$ -Blätter keine geeigneten Epitope bieten, sollte im Antigen kein Cystein vorhanden sein. Ein zusätzlicher Vorteil der FNIII-A3 Domäne ist ihre C-terminale Lage im *hTNC-1*-Molekül. Die Untereinheiten im *hTNC-1*-Hexamer sind N-terminal miteinander verbunden, so dass ein geeignetes Epitop weit C-terminal liegen sollte, um dem Antikörper einen guten Zugang zum entsprechenden Epitop zu ermöglichen. FNIII-A3 (cDNA und Aminosäuresequenz siehe Abb. 3.9) ist aufgrund der zahlreichen Epitope mit hohem Antigenizitätsindex und der C-terminalen Lage im *hTNC-1* als Antigen geeignet.

Predicted Structural Class of the Whole Protein: R Deléage & Roux Modification of Nishikawa & Ooi 1987	
Analysis	Whole Protein
Molecular Weight	21732.32 m.w.
Length	197
1 microgram =	46.014 pMoles
Molar Extinction coefficient	30440±5%
1 A(280) =	0.71 mg/ml
Isoelectric Point	4.78
Charge at pH 7	-13.39

Whole Protein Composition Analysis			
Amino Acid(s)	Number count	% by weight	% by frequency
Charged (RKHYCDE)	53	33.14	26.90
Acidic (DE)	26	14.67	13.20
Basic (KR)	11	7.65	5.58
Polar (NCQSTY)	48	25.06	24.37
Hydrophobic (AILFWV)	69	33.96	35.03
A Ala	14	4.58	7.11
C Cys	0	0.00	0.00
D Asp	12	6.35	6.09
E Glu	14	8.32	7.11
F Phe	4	2.71	2.03
G Gly	16	4.20	8.12
H His	10	6.31	5.08
I Ile	7	3.64	3.55
K Lys	2	1.18	1.02
L Leu	21	10.93	10.66
M Met	3	1.81	1.52
N Asn	9	4.73	4.57
P Pro	14	6.26	7.11
Q Gln	8	4.72	4.06
R Arg	9	6.47	4.57
S Ser	8	3.21	4.06
T Thr	17	7.91	8.63
V Val	19	8.67	9.64
W Trp	4	3.43	2.03
Y Tyr	6	4.51	3.05
B Asx	0	0.00	0.00
Z Glx	0	0.00	0.00
X Xxx	0	0.00	0.00
Ter	0	0.00	0.00

Abbildung 3.6: Sequenzanalyse und physikalische Eigenschaften der Primärstruktur der FNIII-A3 Domäne (His-tagged-*hTNC-1*(P1257-V1428)). Software DNASTAR, Protean

### 3.1.3 Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors für die rekombinante Herstellung des Antigens

Der Primer 5'-NM\_002160(4131-4151) bindet im Exon FNIII-A3 und amplifiziert mit dem Gegenstrangprimer 3'-NM\_002160(4622-4773), der im Exon FNIII-A4 bindet, ein ca. 490 bp langes PCR-Produkt, nämlich die FNIII-A3 Domäne der *hTNC* Isoform 1 und 3. Es wurden ausschließlich cDNA's der GBM Biopsate, die in 3.1.1 positiv getestet wurden, für den Nachweis von FNIII-A3 verwendet. Die cDNA für FNIII-A3 wurde mittels PCR durch reverse Transkription von GBM-gesamt-RNA erfolgreich amplifiziert. Anschließend wurde mit Hilfe eines zweiten Primerpaares: 5'-TOPOPep1 und 3'-Pep1-TAG die gleiche Domäne erneut amplifiziert. Dieses zweite Primerpaar fügt die Erkennungssequenz für die Topoisomerase I am 5'-Ende des PCR-Produktes und ein Stop Codon TAG für die Termination der Translation in *E. coli* am 3'-Ende des PCR-Produktes ein. Die Erkennungssequenz ist für das gerichtete Klonieren in den Vektor pET151/D-TOPO (Fa. Invitrogen) notwendig. Das Insert wurde am N-Terminus mit einem His-Tag (6 x His) für die spätere affinitätschromatographische Aufreinigung fusioniert (Abb. 3.7). Dieses Polypeptid wurde im Folgenden kurz His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) genannt und hat ein MW von 21,7 kDa.

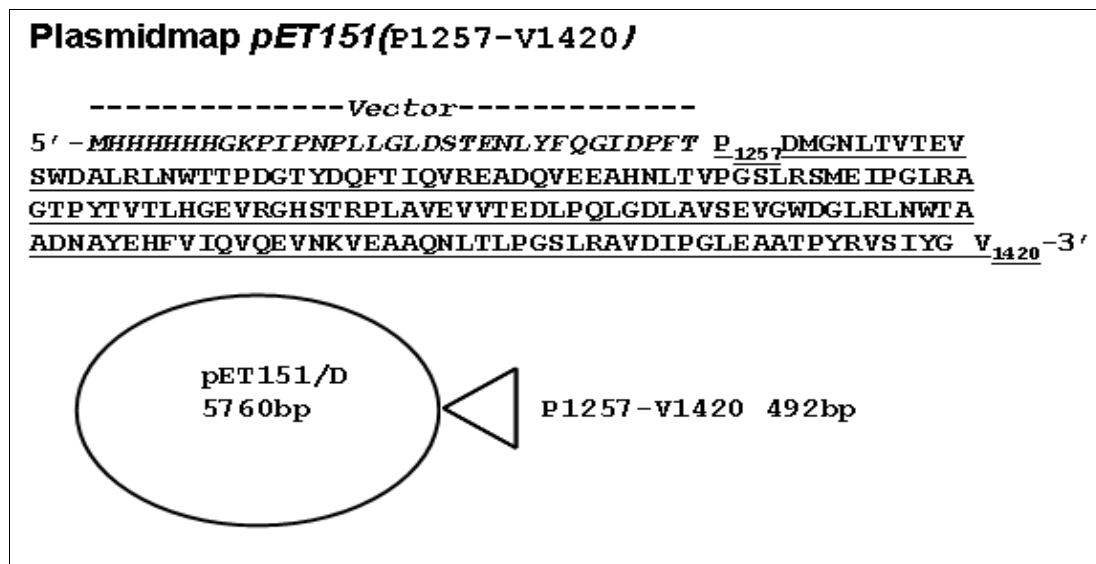


Abbildung 3.7: Vektorkonstrukt pET151/D-TOPO-hTNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>); *hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) bezeichnet die FNIII-A3-Domäne der *hTNC*1; die Sequenz des Antigens ist unterstrichen

Für die bakterielle Herstellung dieses Polypeptides wurden chemikompetente *E. coli* TOP10 transformiert und auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatten selektioniert.

Von positiven Klonen wurde eine Kontroll-PCR und je eine 5 ml ÜNK (LB<sub>amp</sub>) angesetzt. Ebenso wurde eine Masterplatte als Backup für die Sicherung der hier ausgewählten Klone angelegt. Das Konstrukt der positiv selektionierten Kolonien wurde in vier verschiedenen PCR-Ansätzen getestet, um die richtige Orientierung im Vektor zu bestätigen (Abb. 3.8):

**T7 und T7-term:** binden spezifisch an der Vektorsequenz strangauf- bzw. -abwärts des Inserts und amplifizieren von Klonen, die das pET151/D-TOPO-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) Vektor-Konstrukt enthalten, ein ca.~750 bp Produkt.

**5'-TOPOPep1 und T7-term:** der 3'-Primer bindet an der Insert DNA, der 5'- im Vektor und führt bei richtiger Orientierung des Inserts im Vektor zu einem Produkt der Größe ~ 560 bp.

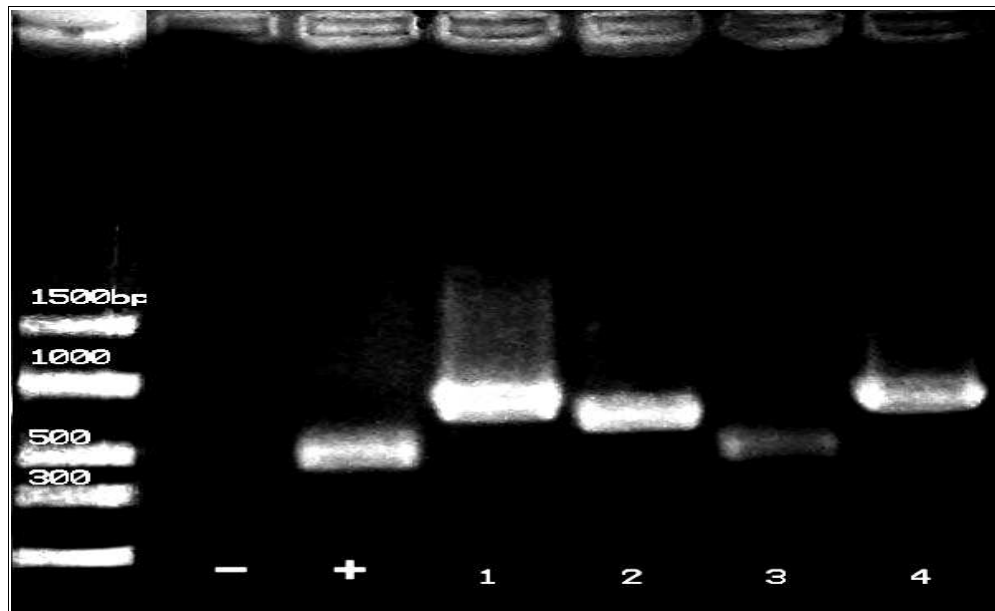


Abbildung 3.8: Kontroll-PCR: Vektor DNA einer positiv selektionierten TOP10-*E. coli* Kolonie: links: 100 bp Ladder Fa. NEB; "- " bezeichnet die negativ Kontrolle und "+" die positiv Kontrolle mit gesamt-cDNA aus Gliombiopsat und  $\beta$ -Aktin Primer; 1,2,3 und 4: PCR-Ansätze der zu testenden Kolonie

**T7 und 3'-Pep1-TAG:** der 5'-Primer bindet an der Insert DNA, der 3'-Primer im Vektor und führt bei richtiger Orientierung des Inserts im Vektor zu einem PCR-Produkt der Größe von ~700 bp

**5'-TOPOPep1 und 3'-Pep1-TAG:** genspezifische A3 Primer: Produkt ~ 500 bp.

Mit positiven Klonen, die das Insert His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) (Abb. 3.8) in der richtigen Orientierung beinhalten, konnten die vier PCR-Ansätze erfolgreich durchgeführt werden. Die Richtigkeit der Nukleotidsequenz des Inserts (A3-Domäne) wurde durch die anschließende DNA-Sequenzierung durch die Fa. Sequiserve/Vaterstetten bestätigt (Abb. 3.9). Es wurden von fünf positiven Klonen Glycerin-Dauerkulturen bei -80°C konserviert.

ATCACCATCCGCGGGGTCAGGACTTCAGCACAACCCCTCTCTGTTGAAGTCTTGACA	
I T I R G V T Q D F S T T P L S V E V L T	aa1253
GAGGAGGTTCCAGATATGGGAAACCTCACAGTGACCGAGGTTAGCTGGGATGCTCTCAGACTG	
E E V P D M G N L T V T E V S W D A L R L	
AACTGGACCAGCCAGATGGAACCTATGACCACTTTACTATTTCAGGTCAGGAGGCTGACCA	
N W T T P D G T Y D Q F T I Q V Q E A D Q	
GTGGAAGAGGCTCACAATCTCAGGTTCTGCGCAGCCTGCGTTCCATGGAAATCCAGGCCTC	
V E E N L T V P G A H S L R S M E I P G L	
AGGGCTGGCACTCCTTACACAGTCACCCCTGCACGGCGAGGTCAGGGGCCACAGCACTCGACCC	
R A G T P Y T V T L H G E V R G H S T R P	
CTTGCTGTAGAGTTCGTACAGAGGATCTCCACAGCTGGGAGATTTAGCCGTGTCTGAGGTT	
L A V E V V T E D L P Q L G D L A V S E V	
GGCTGGGATGGCCTCAGACTCACTGGACCGCAGCTGACAATGCCTATGAGCACTTTGTCATT	
G W D G L R L N W T A A D N A Y E H F V I	
CAGGTGCAGGAGGTCAACAAAGTGGAGGCAGCCAGAACCTCACGTTGCCTGGCAGCCTCAGG	
Q V Q E V N K V E A A Q N L T L P G S L R	
GCTGTGGACATCCCGGGCCTCGAGGCTGCCAGCCTTATAGAGTCTCCATCTATGGGGTGATC	
A V D I P G L E A A T P Y R V S I Y G V I	
CGGGGCTATAGAACACCACTACTCTGCTGAGGCCTCCACAGCCAAAGAACCTGAAATTGGA	
I R G Y R T P V L S A E A S T A K E P E I	aa1441

Abbildung 3.9: Die durch Sequenzierung bestätigte Nukleotid- und Aminosäure-Sequenz der FNIII-A3 Domäne der *hTNC*-1 (von der Fa. Sequiserve/Vaterstetten durchgeführt)

### 3.1.4 Heterologe Expression des His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) in *E. coli* BL21 (DE3)

Für die heterologe Expression des His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) wurde das Vektorkonstrukt pET151/D-TOPO-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Von einer 5 ml BL21-ÜNK wurden Dauerkulturen angelegt.

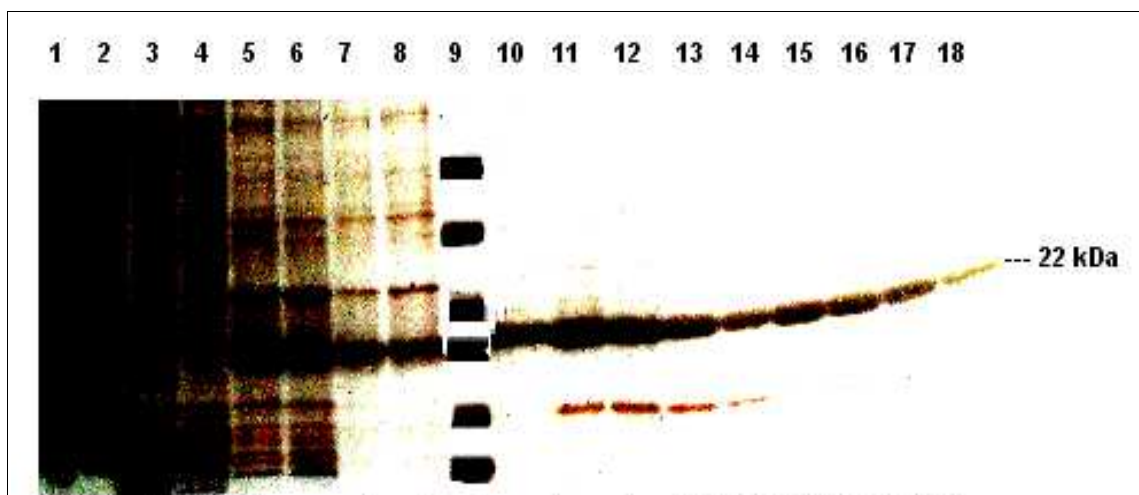
Nach erfolgreicher Selektion auf LB<sub>amp/cam</sub>-Agar-Platten wurde die Expression des Antigens wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt.

Das Pilot-Experiment (3.2.4.1) zeigte, dass bereits nach 3 h die mit IPTG induzierte Expression gestoppt werden kann, da zu diesem Zeitpunkt genügend Antigen gebildet wurde. Nach einer weiteren Stunde wurde das exprimierte Polypeptid in den Nahrungsvakuolen, die typischerweise bei überexprimierten Polypeptiden in *E. coli* entstehen, verschlossen. Das Polypeptid aus diesen Vakuolen unter nativen Bedingungen aufzureinigen ist nicht möglich.

## Ergebnisse

*Tabelle 3.3: Elutionsprofil einer Ni-NTA-affinitätschromatographischen Aufreinigung des rekombinanten His<sub>6</sub>-tagged-hTNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>); Nachdem mit den Wasch-Puffern B und C unspezifisch an der Säule haftende Verunreinigungen entfernt wurden, konnte mit dem Elutionspuffer E das Polypeptid eluiert werden; die gelb unterlegten Fraktionen wurden gepoolt, gegen PBS dialysiert und die Konzentration auf 1 mg/ml eingestellt.*

	OD280nm	C in mg/ml	Volumen d. Fraktion
Waschen mit Puffer B	2,78		1,5 ml
Waschen mit Puffer B	3,98		1,5 ml
Waschen mit Puffer B	2,30		1,5 ml
Waschen mit Puffer B	0,33		1,5 ml
Waschen mit Puffer B	0,12		1,5 ml
Waschen mit Puffer C	1,09		1,5 ml
Waschen mit Puffer C	0,79		1,5 ml
Waschen mit Puffer C	0,55		1,5 ml
Waschen mit Puffer C	0,42		1,5 ml
Waschen mit Puffer C	0,15		1,5 ml
Waschen mit Puffer C	0,25		1,5 ml
Waschen mit Puffer C	0,08		1,5 ml
Waschen mit Puffer E	1,94	1,94	1,0 ml
Waschen mit Puffer E	2,65	2,65	1,0 ml
Waschen mit Puffer E	1,14	1,14	1,0 ml
Waschen mit Puffer E	0,28	0,28	1,0 ml
Waschen mit Puffer E	0,4	0,4	1,0 ml
Waschen mit Puffer E	0,1		1,0 ml



*Abbildung 3.10: SDS-PAGE & Silberfärbung: Ni-NTA affinitätschromatographische Aufreinigung des rekombinanten His<sub>6</sub>-tagged-hTNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>): apparentes MW: ca. 22 kDa 1: Lysat v. Säule; 2: Lysat nach Säule; 3,4: Waschen mit Puffer C; 5,6: Waschen mit Puffer D1; 7,8 Waschen mit Puffer D2; Kaleidoskop Längenstandard Fa. Biorad; 10-18 Elution mit Puffer E*

Die eigentliche Expression lieferte eine Ausbeute von ca. 4 - 6,5 mg His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>). Aufgereinigt wurde wie unter 2.3.1 beschrieben. Es wurden nur die Fraktionen verwendet, die zu mindestens 90% homogene His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>)-Lösungen waren (Tab. 3.3, gelb unterlegte Fraktionen). Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug 1 - 1,5 ml. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde bei 280 nm die Absorption bestimmt (Tab. 3.3).

Das Bakterienlysat vor und nach der Säule, jeweils zwei Waschfraktionen und jede Fraktion der Elution wurden im SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.10). Die derart aufgetrennten Proteine wurden mit Silbernitrat angefärbt. Die Silberfärbung zeigte, dass, nachdem unspezifisch gebundenes Protein mit den Waschpuffern B, C, und D von der Säule entfernt wurden, praktisch sauberes His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) mit Puffer E, pH 4,5 und ohne den Zusatz von Imidazol von der Säule eluiert werden konnte (siehe Abb. 3.10 und Tabelle 3.3).

Das derart aufgereinigte Polypeptid wurde gegen physiologisches PBS dialysiert (PD-10-Dialyse-Säulen, Fa. GE Healthcare), die Konzentration auf 1 mg/ml eingestellt, á 100 µl aliquotiert und bei -20°C konserviert.

## 3.2 Generierung muriner monoklonaler Antikörper

### 3.2.1 Immunisierung von Mäusen mit His<sub>6</sub>-tagged-*h*TNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>)

Die Immunisierung von 5 weiblichen Balb/c Mäusen wurde wie unter 2.6.1. beschrieben durchgeführt. Die Titerbestimmung erfolgte mittels indirektem ELISA auf Antigen (AG) beschichteten 96-Loch-Platten (siehe 2.4.1). Alle 5 Tiere zeigten nach der 4ten Immunisierung (3ter Boost) einen Titer, der bei über 1: 328 050 lag (Abb. 3.11).

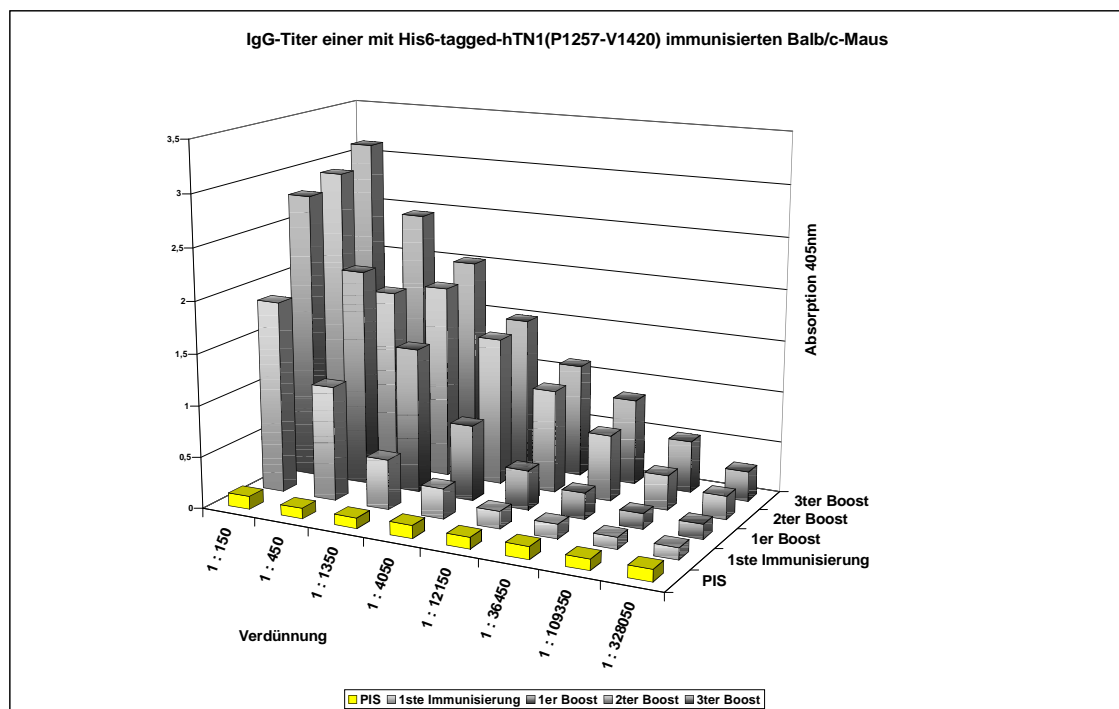


Abbildung 3.11: Indirekter ELISA mit beschichteten AG-Platten zur Titerbestimmung immunisierter Mäuse (hier von einer Maus). Die gemessenen Werte sind Background-korrigiert. Der Titer dieses Tieres steigt von Boost zu Boost auf 1 : 328 050. Gemessen wurde die Antigenbindekapazität mittels indirektem ELISA des PIS (Preimmunserum) und der Seren die nach den Immunisierungen: 1sten-, 2ten- und 3ten-Boost dem Tier entnommen wurden.



### 3.2.2 Immortalisierung *muriner* B-Zellen und Selektion dieser mittels indirektem ELISA

Die erfolgreich immunisierten Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und es wurde die Milz steril entnommen (siehe 2.5.7). Die erfolgreiche Fusion dieser B-Zellen mit den Zellen der Linie P3X63Ag8.653 erfolgte gemäß Protokoll 2.5.8 und ergab genügend Fusionsereignisse. Dies konnte anhand der zahlreichen fusionierten Zellen (meist Myeloma-Myeloma-Fusionsereignisse), mikroskopisch beurteilt werden (Abb. 3.12 links). Hybridoma-Zellen (Antikörper produzierende Zellen) präsentieren den Antikörper, den sie sezernieren, an der Zellmembran. Mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper konnte die an der Oberfläche dieser Zellen präsentierten Antikörper vom Typ IgG nachgewiesen werden. Dieser Nachweis wurde zur Bestimmung des sogenannten „producer“-Anteils einer Zelllinie (Abb. 3.12 rechts) durchgeführt. Zelllinien, welche einen geringeren Anteil als 90% an Antikörperproduzierenden Zellen aufwiesen, wurden nicht weiterkultiviert. Sogenannte „Non-producer“ haben gegenüber den „Producern“ eine erhöhte Wachstumsrate, wodurch sie die Antikörperproduzierenden Zellen innerhalb einer Linie zahlenmäßig innerhalb weniger Generationen überholen würden. Anschließend an die HAT-Selektion wurden die so erhaltenen Hybridoma im HT-Erholungsmedium mittels indirektem ELISA auf ihre Affinität (*in vitro* wurde die monovalente Affinität eines mAk bestimmt) gegenüber dem zur Immunisierung verwendeten Antigen getestet. Es wurden nur Kulturen der Vereinzelung zugeführt, deren Antikörper produzierender Zellanteil höher als 90% war und die gleichzeitig im ELISA ein mindestens vierfach höheres Signal im Vergleich zu

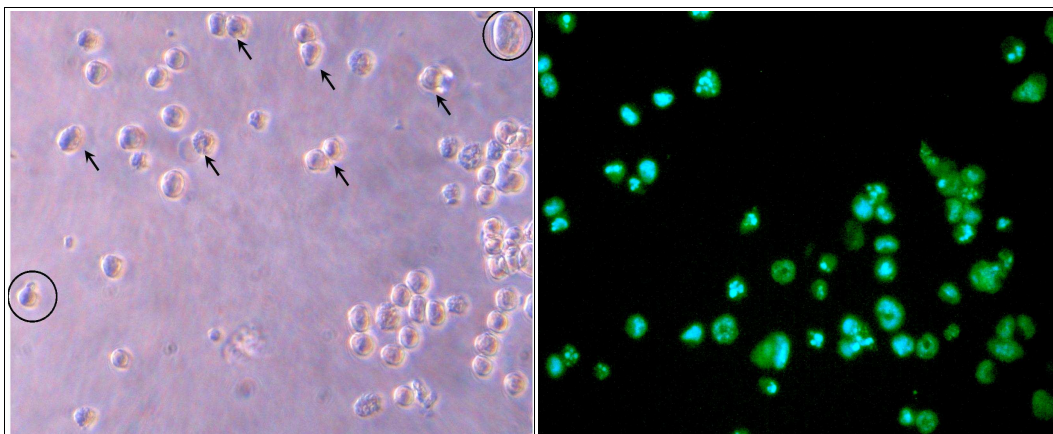


Abbildung 3.12: B-Zellen unmittelbar nach der Fusion mit P3XAg8.653: linkes Bild: Kreise: Fusionsereignisse B-Zelle/Myeloma; Pfeile: Ereignisse Myeloma/Myeloma; rechtes Bild: Immunfluoreszenz-Nachweis Antikörper produzierender Hybridoma-Zellen: ca. 90% aller Zellen dieser Kultur sind Antikörper produzierende Hybridoma (grün); Zellkerne sind DAPI-blau gegengefärbt (blau).

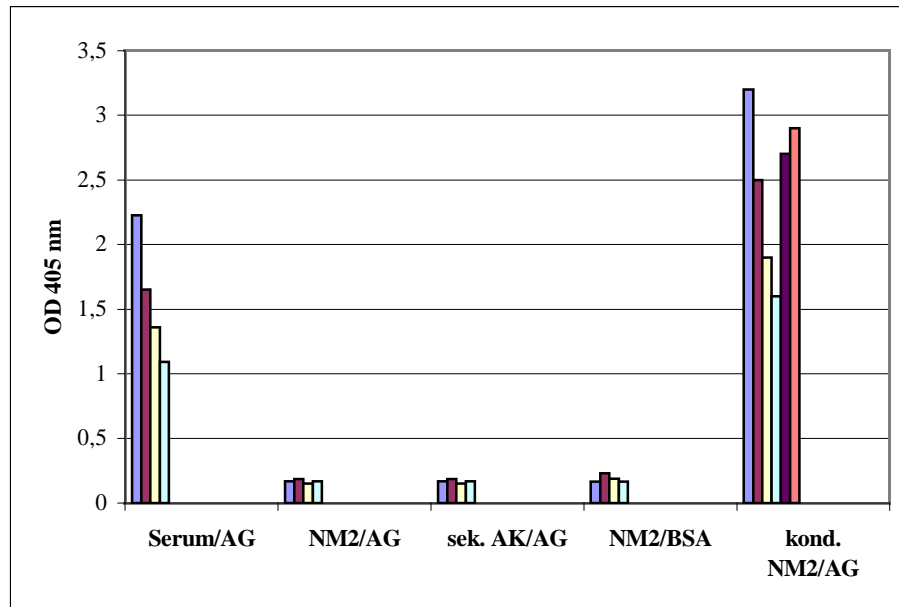


Abbildung 3.13: Indirekter ELISA: Affinitätsanalyse konditionierte Hybridoma Medien gegenüber dem zur Immunisierung verwendeten Antigen der Klone WGG001, WGG008, WGG6A6/4, WGG6C5/8, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4 in NM2-Medium (kond. NM2/AG blau bis rot); Positiv Kontrolle: Verdünnungsreihe 4tes Serum: 1:150(blau) bis 1:4050(türkis); Negativ Kontrollen 4 fach: NM2 auf AG und sek. mAk auf AG 4 fach; NM2 auf BSA 4 fach

den Kontrollen zeigten. Die Vereinzelung wurde mittels „limiting-dilution“-Klonierung (2.5.10) durchgeführt. Derart wurden etwa hundert verschiedene immortalisierte Hybridoma-Zelllinien analysiert.

Vereinzelt wurden insgesamt 25 Hybridoma-Kulturen, die die höchste Affinität gegenüber dem Antigen (2.5.10) aufwiesen. Die vereinzelteten Zellen, die zum Wachstum monoklonaler Zelllinien führten, wurden erneut in einem indirekten ELISA mit AG beschichteten Platten getestet. Nur diejenigen monoklonalen Hybridoma-Klone wurden weitergeführt, die im indirekten ELISA die höchste Affinität gegenüber dem AG zeigten. Es wurden 6 verschiedenen Klone weitergeführt: WGG001, WGG008, WGG6A6/4, WGG6C5/8, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4, die wie in Abb. 3.13 (kond. NM2/AG) gezeigt deutliche Unterschiede in ihrer Affinität zum AG zeigten. Weitere getestete Klone zeigten keine oder eine geringere spezifische Reaktion mit dem Antigen und wurden deshalb nicht weitergeführt. Alle sechs Antikörper zeigten keine Kreuzreaktivität (Extinktion < 0,200) mit BSA. Das serumfreie Kulturmedium (NM2, Negativkontrolle) zeigte ebenfalls keine spezifische Reaktion (Mittelwert der Extinktion hier < 0,200).

### 3.2.3 Adaptation an serumfreies Medium und Bioreaktor

Die im ELISA positiven Klone wurden nach der Selektion an das Wachstum in serumfreiem Medium adaptiert. Dies erfolgte durch stufenweise Reduktion des FCS-Gehaltes in einem chemisch definierten Medium (SFM) der Fa. Invitrogen. Die Antikörperproduktion wurde dabei ständig überprüft. Es wurde ebenso der mAk-Gehalt konditionierter NM3-Medien (Medium für das Versorgungsmodul im Bioreaktor) sowie der des SFM-Mediums mit den Zusätzen des NM3-Mediums (SFMplus) überprüft (Abb. 3.14). Die hier analysierten konditionierten Medien der Klone WGG001 und WGG008 zeigten eine um ein Drittel erhöhte mAk-Produktion in den FCS-haltigen Medien NM2, NM3 und SFMplus (SFM+) verglichen mit dem FCS-freien Medium SFM (SFM-). Zeigten die Hybridoma-Klone des weiteren ein gutes Wachstum in serumfreiem SFM-

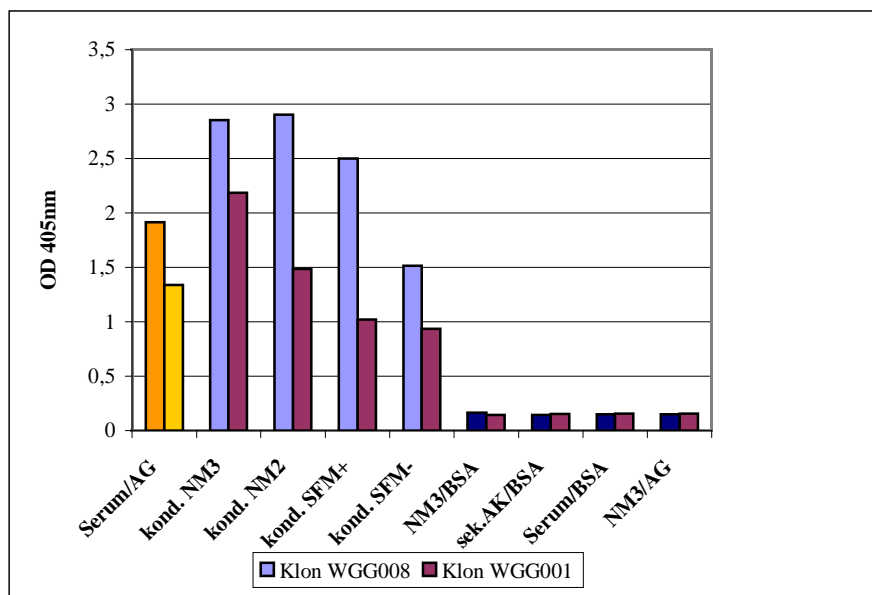


Abbildung 3.14: Indirekter ELISA: Affinitätsanalyse konditionierter Hybridoma Medien gegenüber dem zur Immunisierung verwendeten Antigen der Klone WGG001 und -008 in NM2, NM3, SFM+ und SFM-Medium; Positivkontrolle: Verdünnungsreihe 4tes Serum: 1:1350 und 1:4050; Negativkontrollen 2 fach: NM2 auf AG und sek. mAk auf AG; NM2 auf BSA - 2 fach

Medium, wurde die Produktion im Bioreaktor gestartet. Da die Zellen auf die Zusätze der vollständigen Medien nicht verzichten konnten, ohne dass die mAk-Produktion dadurch verringert wurde, wurde das Versorgungsmodul mit dem vollständigen NM3-Medium befüllt. Die Zellen erreichten eine hohe Zellzahl von bis zu  $10^7$  Zellen/ml bei einer mindestens 90%igen Viabilität. Der mAk-Gehalt im Bioreaktor konnte derart um das 5-10fache gesteigert werden (siehe 3.2.3).

### 3.3 Affinitätschromatographische Protein A Reinigung der monoklonalen Antikörper

Konditionierte serumfreie Hybridoma-Medien der Klone WGG001, WGG008, WGG6A6/4, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4 wurden zu je 500 ml aufgereinigt (siehe 2.3.3). Die Tabelle 3.4 zeigt beispielhaft die Aufreinigung der konditionierten Zellkulturmedien des Klonen WGGD4-B4. Für die weiteren Klone konnten weniger hohe Erträge erzielt werden (durchschnittlich 2-10 mg/500 ml konditioniertes Medium). Die Konzentration des Antikörpers WGGD4-B4 in den einzelnen Fraktionen wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt (Tab. 3.4). Die gelb unterlegten Fraktionen wurden vereinigt und mit Centricon Zentrifugenröhrchen (MWCO 30 kDa) ankonzentriert.

*Tabelle 3.4: Bestimmung der Proteinkonzentrationen der eluierten Fraktionen der Protein A Reinigung konditionierter Zellkulturüberstände der Hybridomalinie WGGD4-B4: die gelb unterlegten Fraktionen wurden vereinigt und ankonzentriert.*

Fraktion	Proteinkonzentration [mg/ml]	Fraktion	Proteinkonzentration [mg/ml]
E1	0,01	E8	2,502
E2	0,013	E9	6,170 (1:10 gemessen: 0,617)
E3	0,008	E10	4,591(1:10 gemessen: 0,459)
E4	0,008	E11	1,743
E5	0,028	E12	0,852
E6	0,748	E13	0,3
E7	1,899	E14	0,2

Die Fraktionen, welche mAk enthalten, werden einzeln im SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft (Abb. 3.15). Als Größenstandard dient der Marker Kaleidoscope (BioRad). Der Referenz mAk wurde mit analysiert, weil das apparente Molekulargewicht (MW) der schweren Kette der mAk im Glycin-haltigen Laufpuffer im Unterschied zum Glycin-haltigen nicht 50 kDa groß war, sondern ca. 60 kDa betrug. Das apparente MW von 25 kDa entspricht dem tatsächlichen MW der leichte Kette (LC). Konditionierte Medien aus dem Bioreaktor erzielten einen klonabhängigen Ertrag von 2,0 – 10 mg mAk. Die derart aufgereinigten mAk wurden gegen PBS dialysiert und aliquotiert bei -20°C gelagert. Die Qualitätskontrolle nach dem SDS-PAGE (Abb. 3.14) wurde mittels analytischer SEC-HPLC durchgeführt (Abb. 3.16). Es wurde immer ein Standard-mAk als Kontrolle ebenfalls mitgetestet. Sowohl der Standard mAk als auch die in dieser Arbeit aufgereinigten mAk's zeigten eine Retentionszeit von 9,119 Minuten und eine Reihnheit von mindestens 90% (Abb. 3.16).

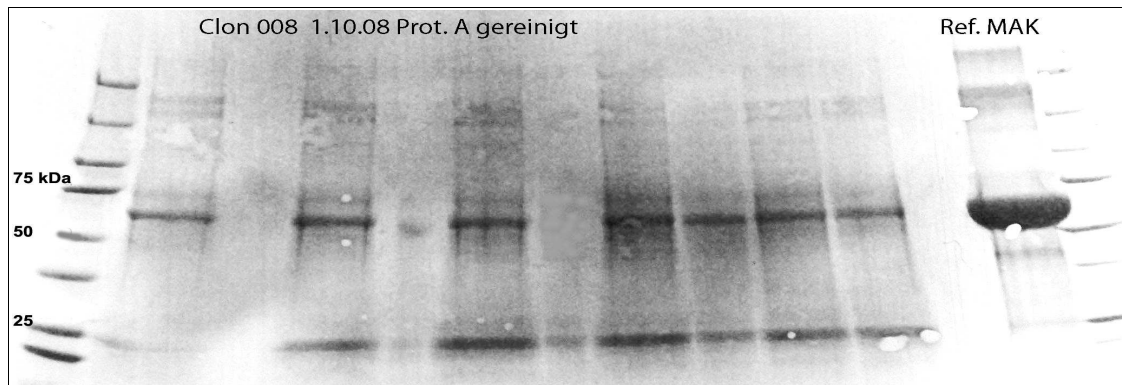


Abbildung 3.15: Coomassie-Blau angefärbte Antikörper-Ketten der aufgereinigten konditionierten Medien des Clons WGG008 nach dem SDS-PAGE: Fraktionen, die mAk enthalten: bei ca. 60 kDa die schwere Kette, bei 25 kDa die leichte Kette des mAk; Ref. MAK bezeichnet einen Referenz IgG

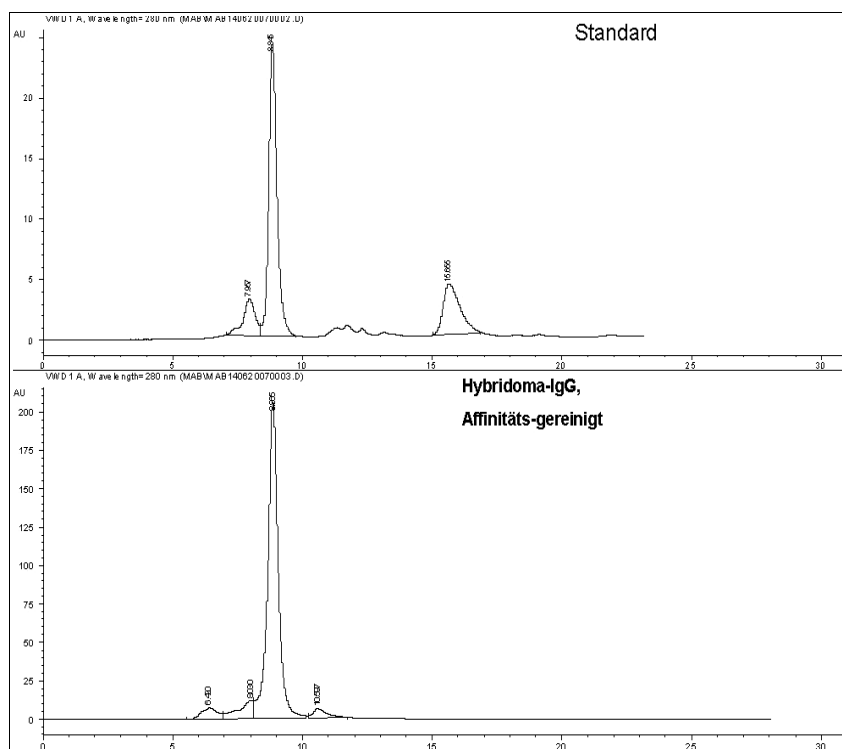


Abbildung 3.16: Analytische SEC-HPLC 20  $\mu$ l (1 mg/ml). Oben: Standard-Antikörper: 1. Peak: mAk-Dimere, 2. Peak: mAk mit einer Retentionszeit von 9,119 min, 3. Peak: niedermolekulare Stabilisatoren. Unten: Protein A gereinigter WGG008: Retentionszeit: 9,119 min; Reinheit ~ 95%.

### 3.4 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper *in vitro*

### 3.4.1 Isotypisierung der monoklonalen Antikörper

Die in dieser Arbeit generierten monoklonalen mAk gegen die tumorassoziierte Spleißisoform des *hTNC* wurden mit dem Kit „Pierce Isotyping Kit-Mouse“ der Fa. Pierce isotypisiert. Die in dieser Arbeit generierten monoklonalen mAk sind allesamt vom Isotyp IgG3 und tragen die kappa-leichte-Kette (Abb. 3.17).

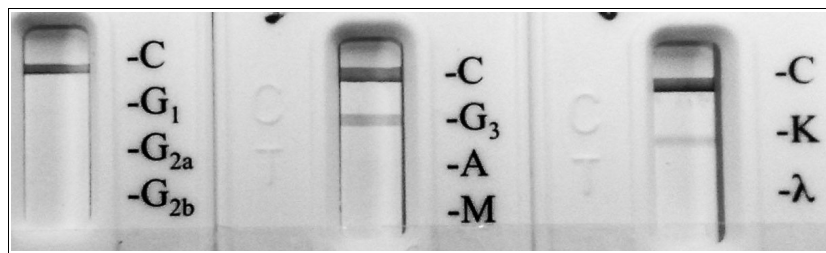


Abbildung 3.17: Isotypisierung monoklonaler Antikörper: hier der Protein A gereinigte monoklonale mAk WGG008 1:1000 verdünnt: HC: Subklasse IgG3; LC wurde vom kappa-Genabschnitt kodiert

### 3.4.2 Charakterisierung der mAk mittels Western Blot

Es wurden alle 6 Protein A gereinigten monoklonalen Antikörper der Hybridomazellklone: WGG001, WGG008, WGG6A6/4, WGG6C5/8, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4 *in vitro* mittels Westernblot auf ihre Spezifität zur tumorassoziierten Spleißisoform 1 des *humanen* Tenascin C (kurz: *hTNC*-1) analysiert. Zu diesem Zweck wurden ca. 50 µg/Spur hitzedenaturierte *humane* GBM-Homogenate in einer 2:1 Verdünnung mit Laemmli-Puffer in einem 4-20%igem Tris-HCl-Gradientengel aufgetrennt. Die Nitrozellulosemembran wurde in einzelne Bahnen zerschnitten und mit den laut ELISA gegen His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) unterschiedlich affinen monoklonalen Antikörpern in Verdünnungen von 1: 1000 inkubiert (Abb. 3.18).

Das *hTNC*-1 hat ein apparentes Molekulargewicht im SDS-Gel von ~ 240 kDa (unglykosylierte Form) und ~ 260 kDa (vollständig glykosylierte Form). Mit allen getesteten Antikörpern wurde der Nachweis der 240 kDa Bande des *hTNC*-1 an GBM-Gewebehomogenaten geführt. D. h., die in dieser Arbeit generierten mAk sind spezifisch für *hTNC*-1 und zeigen keine Kreuzreaktivität im Western Blot mit anderen Proteinen (Abb.3.18). In Gewebehomogenaten WHO°I-II, sowie bei gesunden *humanen* Hirngewebehomogenaten konnte unter gleichen Bedingungen kein Nachweis des *hTNC*-1 geführt werden.

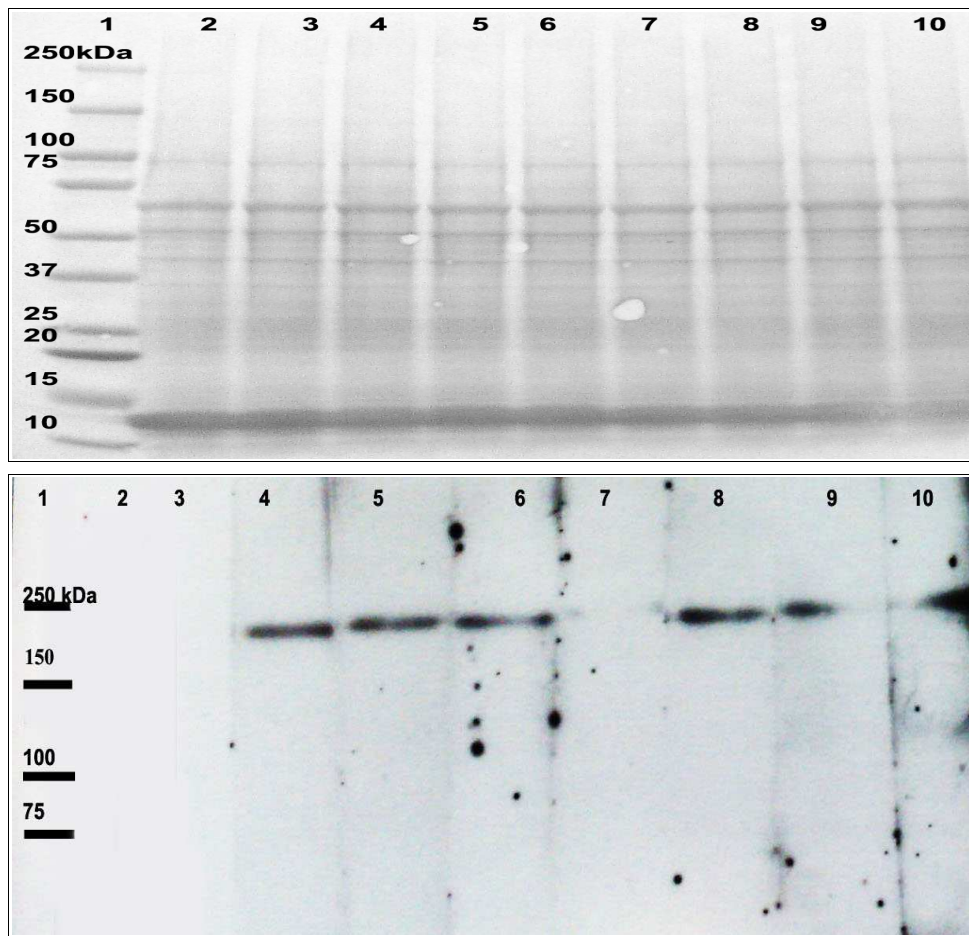


Abbildung 3.18: Western Blot. Oben: Ponceau S-Färbung der im SDS-PAGE aufgetrennten Gewebekomponenten: ca. 50 µg GBM-Gewebekomponente/Spur. Unten: Western Blot: Spur. 1: Längenstandard, 2: neg. Kontr. (Sek. mAk, 1:2500), 3: neg. Kontr. (Milch), 4-6: WGG001,008,6A6/4 1:1000, 7: ein für hTNC-1 neg. Klon, 8-10: WGG6C5/8, WGG1/1-D3, D4-B4 1:1000.

Zum Vergleich wurde der Aszites-Antikörper BC-24, der ebenfalls Protein A gereinigt wurde, im Westernblot mit den gleichen Gewebekomponenten mitgetestet. Er erkannte zwar ebenfalls bei 240 kDa das hTNC-1, kreuzreagierte jedoch mit einigen weiteren Proteinen, die größer oder kleiner 240 kDa sind (Abb. 3.19). Ebenfalls konnte mit BC-24 im nativen Dot Blot und mit gesunden Hirnbiopsaten der Nachweis der Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit nicht Tumor assoziierten Epitopen geführt werden (Abb. 3.19).



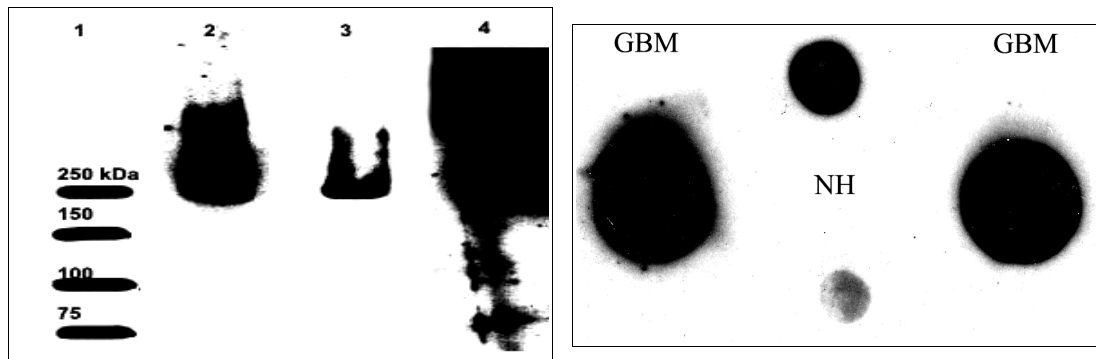


Abbildung 3.19: **Links:** Western Blot: ca. 50 µg GBM-Gewebehomogenat pro Spur. Spur 1: Längenstandard; Spur 2, 3: WGG008, WGGD4-B4 1:100; Spur 4: BC-24 1:100. **Rechts:** Dot Blot: ca. 50 µg GBM-Gewebehomogenat pro Dot: hTNC-1 Nachweis mit BC-24 1:1000; GBM=humaner Gehirntumor WHO°IV; NH=gesundes humanes Hirnbiopsat

### 3.4.3 Immunhistochemische Charakterisierung der Antikörper

Die Protein A gereinigten monoklonalen mAk, die mittels ELISA und Western Blot charakterisiert wurden, wurden nun immunhistochemisch an Cryo-, bzw. HOPE-fixierten Gewebeschnitten untersucht. Erfolgte eine spezifische Bindung, so wurde dies an den Bindungsstellen durch eine Rotbraun-Färbung der Gewebeschnitte sichtbar.

Um einen Eindruck von der Morphologie der Hirngewebe zu gewinnen, wurden sowohl Cryo-, als auch die HOPE-Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Diese Färbung ist eine Übersichtsfärbung, bei der die Zellkerne blau dargestellt werden. Die Antikörper werden an Schnitten von GBM und Normalhirn untersucht. An Cryoschnitten weist man das Epitop in seinem nativen Zustand histochemisch nach, wohingegen die HOPE-Fixierung eine Abwandlung der Paraffinfixierung darstellt und die Proteine ebenso fixiert wie die Gefrierfixierung (relativ nativ), die Struktur der Präparate jedoch wie die Paraffinfixierung gut erhält. Klarer Vorteil der HOPE-Fixierung ist, dass Paraffin ungängige mAk ihr Epitop erreichen können. Die extrazelluläre Matrix (ECM) der GBM-Cryoschnitte wurde durch den WGGD4-B4 intensiv braun gefärbt. Dieser mAk erkennt das TAA hTNC-1 in seiner nativen Konformation (Abb. 3.20). WGGD4-B4 ist spezifisch für die tumorassoziierte Isoform des hTNC, da Cryoschnitte von gesunden Hirnbiopsien negativ bleiben (Abb. 3.20). Die Zellkerne konnten durch die Hämatoxylin Färbung an allen Cryoschnitten gut dargestellt werden. Die Gewebestruktur der hier hergestellten Histopräparate ist demnach gut erhalten. Es handelt sich um ein Riesenzellkern-GBM. Die ECM ist trotzdem gut darstellbar. Aufgrund der



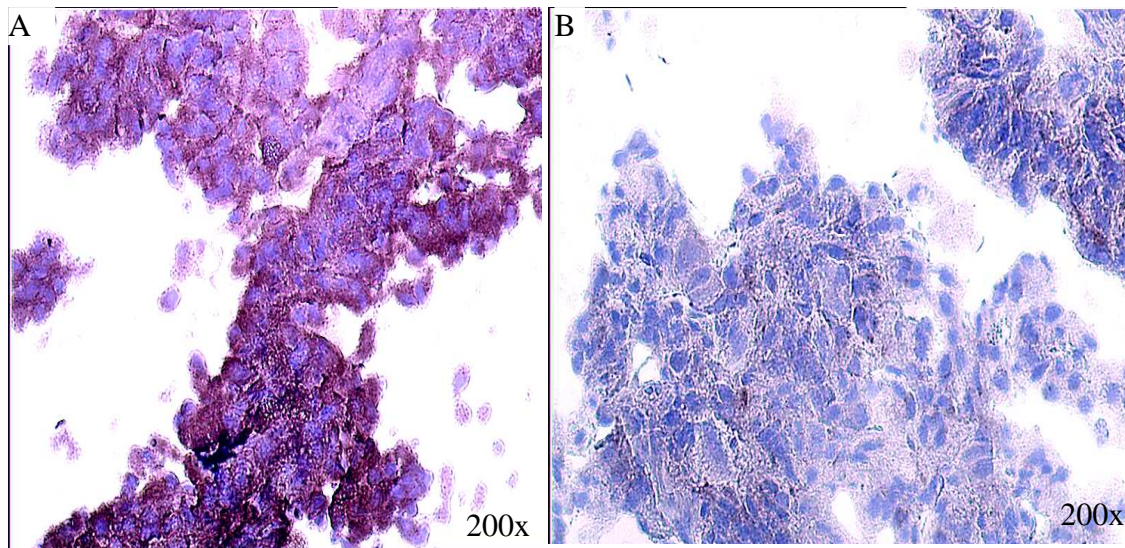


Abbildung 3.20: Immunhistochemische Färbung von Cryoschnitten. Beide Schnitte (A, B) von GBM-Gewebe. Die Zellkerne sind durch Hämatoxillin blau gefärbt. Die Braunfärbung erfolgte durch einen sekundären RAM-HRP-konjugierter-mAk, der DAB/Chromogen umsetzt und zur Braunfärbung an den Stellen führt, wo der primäre mAk gebunden hat. **A:** Färbung mit WGGD4-B4. **B:** negativ Kontrolle mit dem sekundären AK.

eingeschränkten Verfügbarkeit der gefrierfixierten GBM- und NH-Schnitte wurden die 5 weiteren mAk nicht an Cryoschnitten getestet.

Immunhistochemisch gefärbte HOPE-Schnitte einer Dicke von 8 mm von WHO°IV Gliomen, bestätigen das an Cryoschnitten erzielte Ergebnis. Die Schnitte zeigten eine homogene Braunfärbung im Bereich der ECM mit dem mAk WGGD4-B4 (Abb. 3.21).

An Normalhirn konnte mit diesen mAk keine Immunreaktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Ebenso blieben die geführten Kontrollen an GBM-Schnitten negativ - hier wurde kein Primärantikörper, sondern nur Antibody-Diluent (Dako) eingesetzt und es war nur die Hämatoxilin-Färbung der Zellkerne zu sehen (Abb. 4.21).

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden nach Möglichkeit an konsekutiven Schnitten durchgeführt. Die Daten mit den weiteren mAk zeigten ähnlich Resultate, wie die mit dem WGGD4-B4 und -1-D3 erzielten (nicht dargestellt). Sie zeigten alle eine homogene Färbung der ECM. Der mAk WGG6A6/4 zeigte eine leichte Braunfärbung auch an gesunden Hirnschnitten.



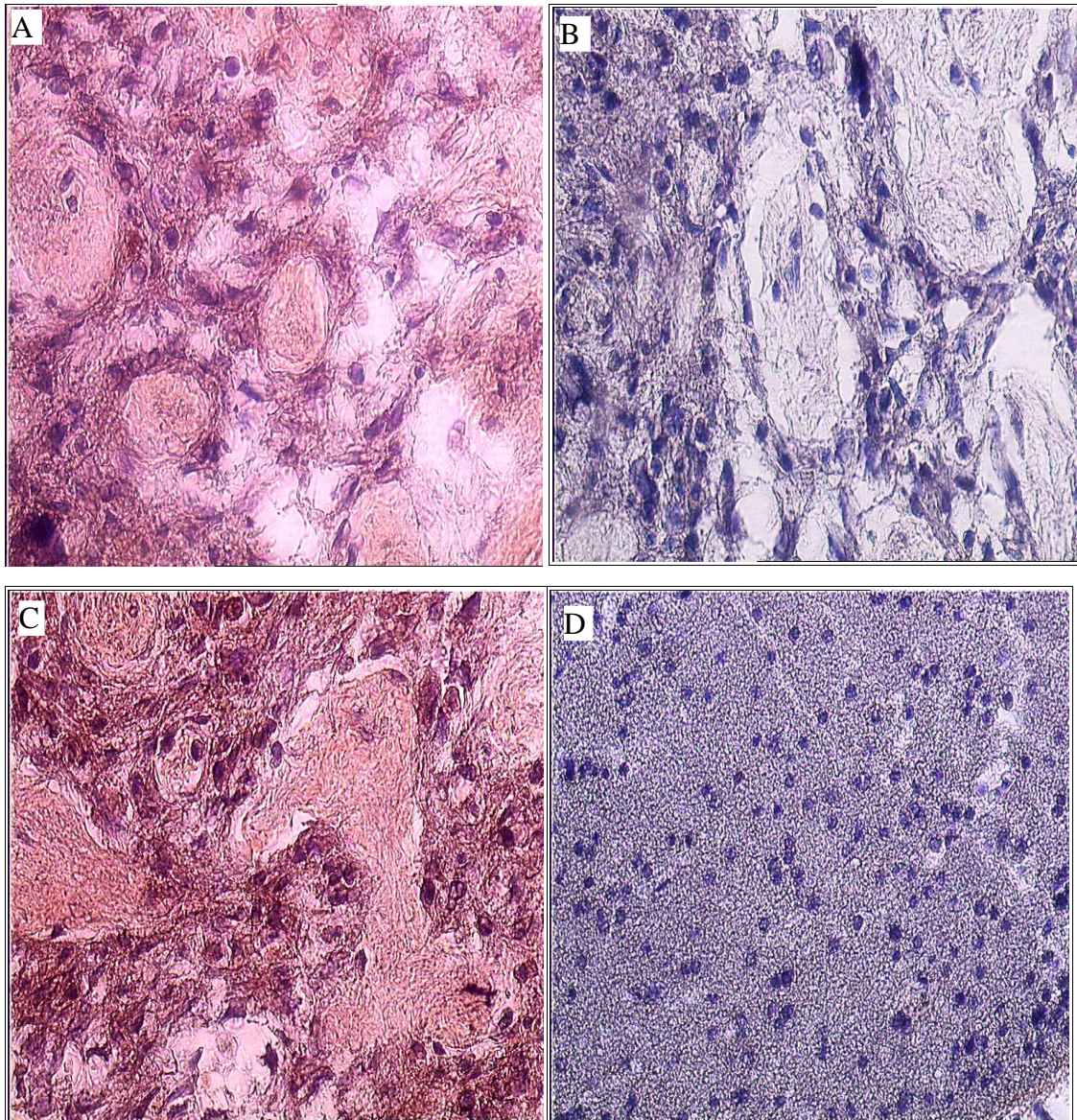


Abbildung 3.21: Immunhistochemische Färbung von konsekutiven GBM-Schnitten (A-C) und Normalhirnschnitt (D), die nach der HOPE-Methode eingebettet wurden. **A:** WGG1/1-D3, **C** und **D:** WGGD4-B4. **B:** Negativkontrolle mit dem sekundären Antikörper (Dako). Die Braunfärbung erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit den primär-Antikörpern WGG1/1-D3 und WGGD4-B4 gefolgt von der Inkubation mit dem sekundären RAM-HRP-konj.-mAk, der DAB/Chromogen umsetzt (braun). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxyllin blau gefärbt. (200 x)



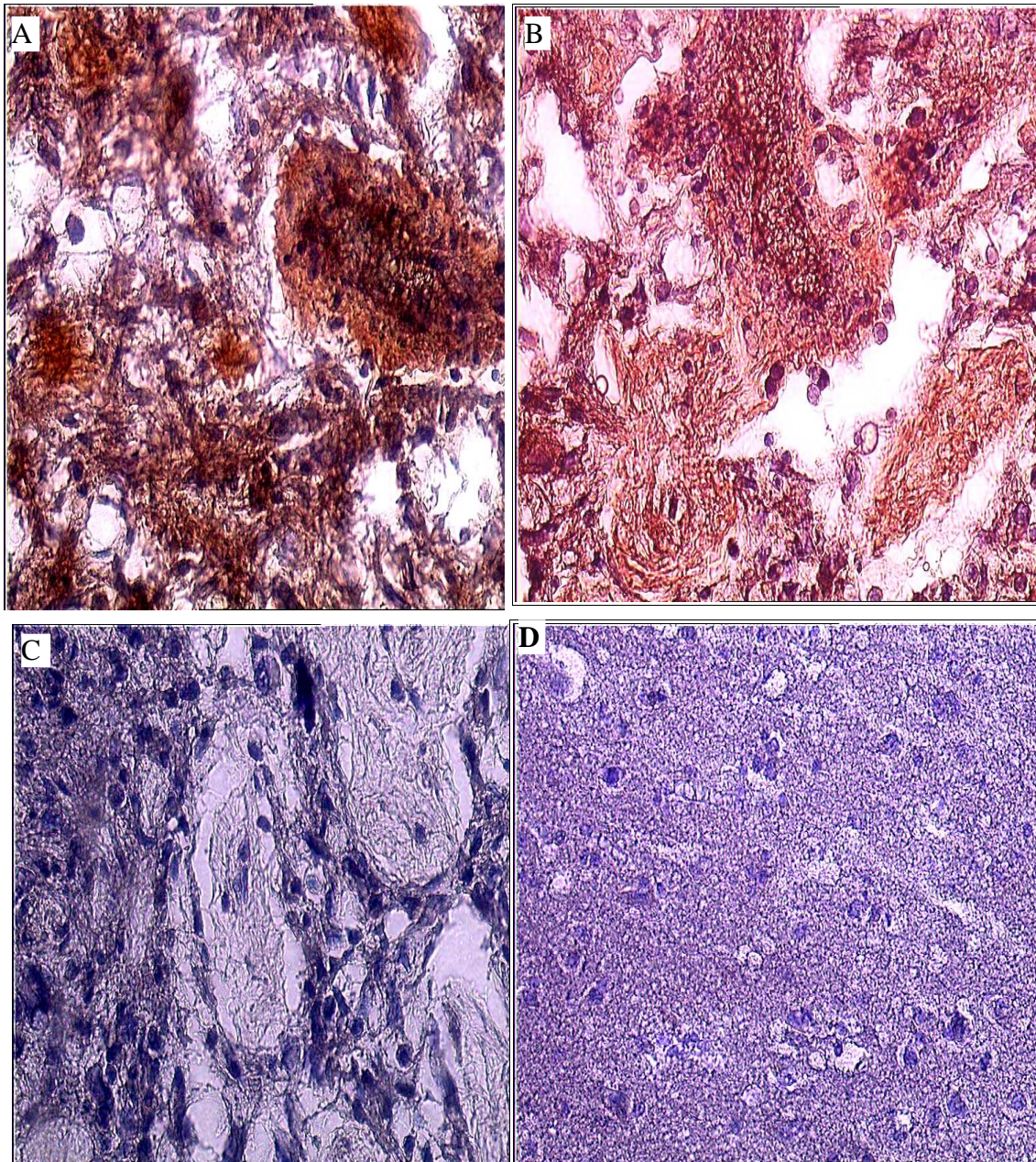


Abbildung 3.22: Immunhistochemische Färbung von konsekutiven GBM-Schnitten (A-C), und Normalhirnschnitt (D), die nach der HOPE-Methode eingebettet wurden. **A:** Nachweis des hTNC-1 mit WGG008 und mit **B:** WGG6A6/4. **C:** Negativkontrolle mit dem antibody-diluent (Dako) inkubiert. Die Braunfärbung erfolgte durch Inkubation der Schnitte mit den primär-Antikörpern WGG008 und WGG6A6/4 gefolgt von der Inkubation mit dem sekundären RAM-HRP-konj.-mAk, der DAB/Chromogen umsetzt (braun). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxillin blau gefärbt.(200 x)



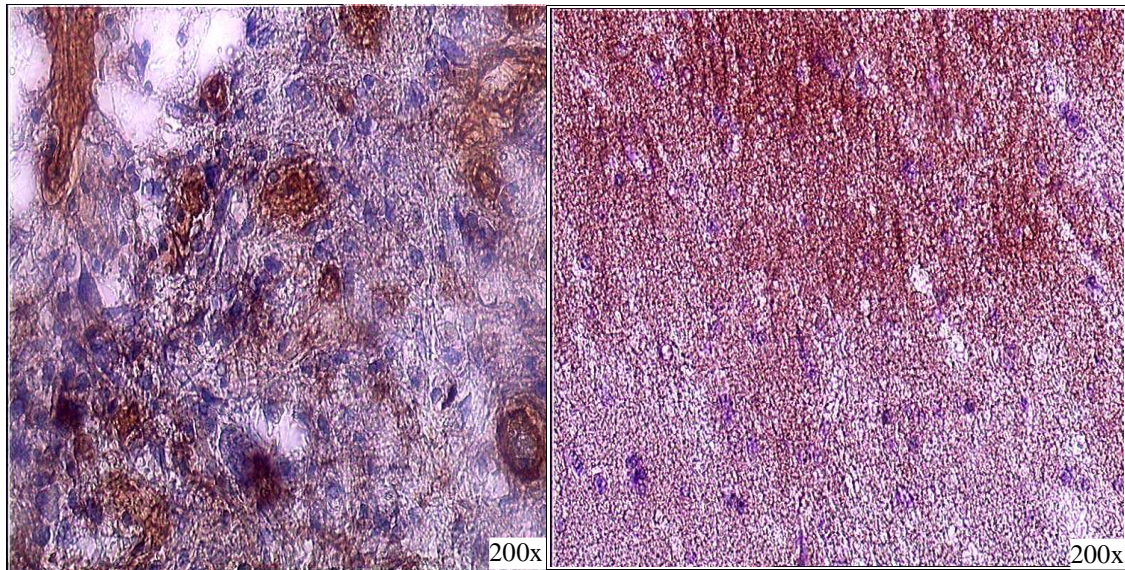


Abbildung 3.23: Immunhistochemische Färbung von GBM-, und Normalhirnschnitten, die nach der HOPE-Methode eingebettet wurden und mit mAk BC-24 behandelt wurden: Linkes Bild: GBM-, rechts: Normalhirnschnitt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin blau gefärbt. Die Braunfärbung erfolgte durch Inkubation mit einem sekundären RAM-HRP-konj.-mAk, der DAB/Chromogen umsetzt.

Alle anderen mAk zeigten keine Reaktion mit Epitopen in gesunden Hirnschnitten (Abb. 3.22). Die immunhistochemische Färbung konsekutiver Schnitte mit dem mAk BC-24 an HOPE-fixierten GBM-Biopsaten zeigt eine heterogene Braunfärbung des ECM. Dieser mAk wurde auch in der Literatur als spezifisch für Strukturen wie Gefäßwände in Hirnneoplasmen beschrieben. In dieser Arbeit wurden ebenfalls hauptsächlich diese Strukturen angefärbt (Abb. 3.23). Eine deutliche Immunreaktion zeigte sich mit diesem mAk auch an gesunden Hirnschnitten. Demzufolge zeigte der mAk BC-24 eine deutliche Kreuzreaktion entweder mit den anderen hTNC Isoformen oder mit anderen Proteinen. Die Negativkontrolle wies nur die blaue Kernfärbung auf. Immunhistochemisch wurde demnach mit denen in dieser Arbeit generierten mAk eine homogene Färbung der ECM in GBM-Schnitten erzielt und somit der Nachweis des hTNC-1 im ECM geführt. Verglichen mit dem mAk BC-24, der bisher für die RIT verwendet wurde, kann mit den neuen Antikörpern (ausgenommen WGG6A6/4) auch zwischen GBM und nicht Tumor Gewebe unterschieden werden.

### 3.4.4 Bestimmung der Antigenerkennung des mAk WGGD4-B4 gegen His<sub>6</sub>-tagged-*h*TNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>)

Die Bindung des mAk WGGD4-B4 an das rekombinante His-tagged-*h*TNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>) wurde mittels indirektem ELISA mit dem zuvor beschriebenen Aufbau (siehe Abschnitt 2.4.4) überprüft (Abb. 3.24). Es konnte eine konzentrationsabhängige Antigenbindungsaktivität mit einer apparenten Dissoziationskonstante von  $35 \text{ nM} \pm 16 \text{ nM}$  und einem  $\Delta A/\Delta T_{\text{max}} = 0,45$  nachgewiesen werden. Die Bindungssignale erwiesen sich als spezifisch, da in der Kontrolle mit BSA nur vernachlässigbare Signale auftraten. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit gereinigtem His-tagged-*h*TNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>)-Antigen (25  $\mu\text{g/ml}$  in PBS/T) beschichtet und anschließend die Oberfläche mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des mAk WGGD4-B4 appliziert. Als Kontrolle diente die Belegung der Vertiefungen mit BSA, wiederum gefolgt von der Inkubation mit einer Verdünnungsreihe des mAk WGGD4-B4. Gebundenes mAk WGGD4-B4 wurde anschließend mit Hilfe eines Anti-murinen C $\kappa$  IgG/AP-Konjugats durch Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen.

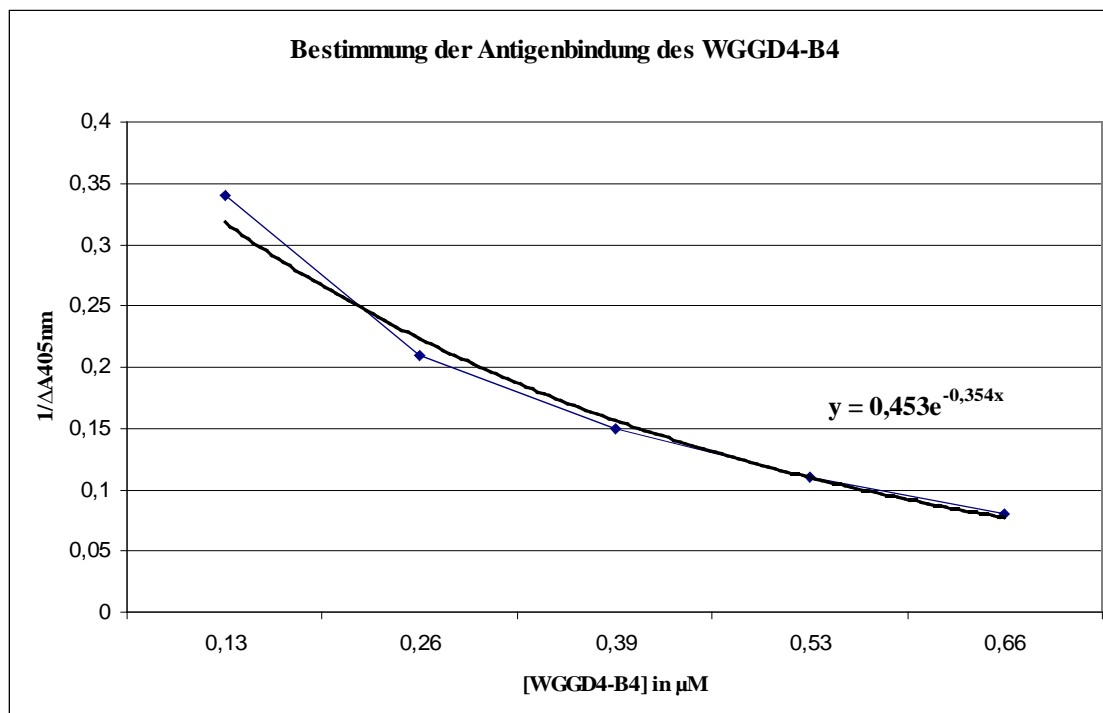


Abbildung 3.24: ELISA zur Untersuchung der *h*TNC-1-Antigenbindung des WGGD4-B4. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ( $\Delta A_{405}/\Delta t$ ) wurde in Abhängigkeit der jeweiligen Konzentration des mAk WGGD4-B4 aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mittels nicht-linearer exponentieller Regression (Exel). Die Steigung der Trendlinie nähert die Kurve der gemessenen Werte sehr gut an.

### 3.5 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper *in vivo*

Bei der Entwicklung eines neuen Therapeutikums ist die Anreicherung und Retention der Wirksubstanz in den Zielorganen und die Verteilung im Organismus sowohl für den Therapieerfolg als auch für das Ausmaß der Nebenwirkungen von großer Bedeutung.

Um die Verteilung nach i.v. Injektion in U87-xenotransplantierten SCID-Mäusen verfolgen zu können, wurden die in dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörper gegen das *hTNC-1* mit dem Radionuklid [ $^{123}\text{I}$ ]Iod oder mit [ $^{111}\text{In}$ ]Indium markiert und die Anreicherung des derart konjugierten Antikörpers in verschiedenen Organen der Tiere mit der Anreicherung im Tumor in Abhängigkeit von der Zeit verglichen.

Zusätzlich wurden an einigen Tieren mittels szintigraphischer Verfahren mit der Zweikopf-Gammakamera ECAM (Fa. Symbia) oder kombiniert mit Computertomographie an dem SPECT-CT Tomographen Symbia (Fa. Siemens) zur bildlichen Darstellung die Verteilung des [ $^{123}\text{I}$ ]Iod- oder [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-konjugierten Antikörpers akquiriert. Es wurden 4 der 6 *in vitro* charakterisierten (und Protein A gereinigten) mit [ $^{123}\text{I}$ ]Iod-konjugierten-mAk *in vivo* getestet: WGG001, WGG008, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4. Mit [ $^{111}\text{In}$ ]Indium wurde der Protein A gereinigte mAk WGGD4-B4 und BC-24 zusätzlich markiert und untersucht.

#### 3.5.1 Kopplung des Radionuklides [ $^{123}\text{I}$ ]Iod an den Antikörper

Es wurden Antikörpermengen von etwa 5 µg pro Maus für die Biodistribution und ca. 50 µg für die Szintigraphie angestrebt. Für die deutlich unempfindlicheren Gammakameras - verglichen mit dem Gammacounter – der humanen Tomographen müssen 10 fach höhere Aktivitätsmengen verabreicht werden, damit die Aquisition erfolgreich durchgeführt werden kann. Die spezifischen Aktivitäten betragen in der Regel 36 GBq [ $^{123}\text{I}$ ]Iod/mol Antikörper. Nach Aufreinigung mittels PD 10 Säule betrug die radiochemische Reinheit ca. 90%. Die Qualitätskontrolle wurde mittels Dünnschichtchromatographie (ITLC-SG, Laufmittel: 0,9% NaCl) und Auslesen am Radiodetektor: MiniGITA, Fa. Raytest durchgeführt (Abb. 3.25).

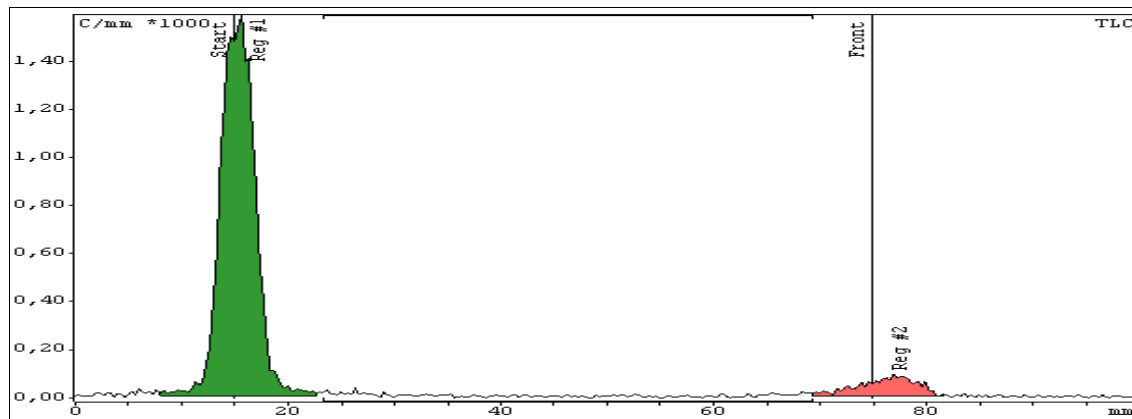


Abbildung 3.25: Qualitätskontrolle des Radionuklid [ $^{123}\text{I}$ ]Iod-konjugierten WGG008: Substanzfleck 1 (grün): [ $^{123}\text{I}$ ]Iod konjugierten WGG008 ( $R_f = 0$ ), Substanzfleck 2 (rot): nicht Protein gebundenes [ $^{123}\text{I}$ ]Iod ( $R_f = 0,6$ ). ITLC-SG, Laufmittel: 0,9% NaCl und Auslesung mit Radioaktivitätsdetektor: Raytest MiniGIT-A, Fa. Raytest.

### 3.5.2 Biodistribution und Biokinetik der [ $^{123}\text{I}$ ]Iod konjugierter mAk

Die Verteilung der Radionuklid konjugierten mAk WGG001, WGG008, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4 wurde wie unter 2.6.2 beschrieben an jeweils 9 U87-xenotransplantierten SCID-Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Eine Gruppe wurde durch den Antikörper und den Zeitpunkt der Erhebung der Dosimetrie nach Tracerinjektion bestimmt. Als Kontrolle wurde Tieren, die keinen Tumor trugen, der jeweils gleiche Tracer injiziert.

Ein erhöhter Background, der auf die unerwünschte spezifische Anreicherung des [ $^{123}\text{I}$ ]Iodes zurückzuführen war, stellte ein großes Problem bei diesem Tracer dar. Der [ $^{123}\text{I}$ ]Iod konjugierte Antikörper wurde *in vivo* enzymatisch dehalogeniert (Zhu *et al.*, 1994). Freies [ $^{123}\text{I}$ ]Iod wurde mit hoher Affinität in der Schilddrüse und an den Organen des Magen-Darm-Traktes, trotz der Gabe des Schilddrüsen Blockers Natriumperchlorat (Handelsnamen: Irenat) angereichert (freies [ $^{123}\text{I}$ ]Iod wird über den Na/I-Symporter spezifisch in der Schilddrüse und im Magen-Darm-Trakt anreichert (Wapnir *et al.*, 2003). Diese Dehalogenierung wird in der Literatur auch für vergleichbare Radioiodierte mAk beschrieben (Zhu *et al.*, 1994).

Der Großteil der Radioaktivität war nur kurz (wenige Stunden) im Blutkreislauf vorhanden und reicherte sich anschließend im Tumor bzw. unspezifisch in den Ausscheidungsorganen und der Schilddrüse an. Die ersten Gruppen wurden 2 h post Injektion euthanasiert, die Organe entnommen und die angereicherte Aktivität im

Gamma-Counter quantifiziert. Ebenso wurde mit den weiteren Gruppen 24 h, 48 h und 72 h verfahren. Auch an Gruppen von jeweils 3 tumorfreien Mäusen wurde die Biodistribution derart untersucht. Die im Gammacounter bestimmten Aktivitätsmengen als %ID/g (injizierte Dosis/Gramm Maus) in den Organen: Tumor, Muskel, Blut, Herz, Milz, Nieren, Darm, Magen, Schilddrüse und Leber wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt (Tab. 3.5).

Die pro Organ angereicherte mittlere Strahlenmenge wurde in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt (Abb. 3.26 und 3.27).

$$Var = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad SD = \sqrt{Var}$$

Die hier getesteten mAk zeigten eine Konzentrationssteigerung am Tumor bis zu 24 h (mit Antikörper abhängigen Anreicherungen von bis zu durchschnittlichen 21% der ID/g Tumor) mit einer anschließenden langsamen Dissoziation vom Zielantigen und somit vom Tumor. Es konnten mit allen Antikörpern noch nach 72 h Aktivitätsmengen von bis zu 16% der ID/g Tumor detektiert werden (Abb. 3.26). Wobei Muskel als Referenzgewebe einen niedrigeren Hintergrund von maximal 5,8% der ID/g Muskelgewebe zeigte (Abb. 3.27). Eine andere Verteilung zeigte sich an der Schilddrüse und im Magen-Darm-Trakt. Hier sind die unerwünschten spezifischen Anreicherungen des durch Dehalogenierung frei werdenden [<sup>123</sup>I]Iodes mit Werten von bis zu 34% der ID/g Gewebe relativ hoch. Bedingt durch den Abbau des Radionuklidmarkierten Antikörpers an der Leber und dessen Ausscheidung über die Nieren, waren diese Organe ebenfalls stark belastet.



Tabelle 3.5: Biodistributionsdaten der [ $^{123}\text{I}$ ]Iod konjugierten *mAk*'s WGG001, WGG008, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4. Aktivitätsmengen als % ID/g (injizierte Dosis/Gramm Gewebe) bzw. die pro Gruppe ermittelten arithmetische Mittel der Tiergruppen und die Standardabweichungen in den Organen: Tumor, Muskel, Blut, Herz, Milz, Nieren, Darm, Magen, Schilddrüse und Leber (Gemessen im Gammacounter).

Gewebe	24 h p.i.	48 h p.i.	72 h p.i.	
<b>Tumor</b>	15,5 ± 0,9	13,1 ± 0,9	11,6 ± 0,9	<b>WGG001</b>
<b>Muskel</b>	7,30 ± 0,7	3,90 ± 0,6	1,90 ± 0,4	
<b>Blut</b>	41,2 ± 1,4	23,2 ± 1,5	11,6 ± 1,3	
<b>Herz</b>	33,6 ± 1,6	21,3 ± 1,3	13,1 ± 1,2	
<b>Milz</b>	38,0 ± 1,2	41,1 ± 1,7	3,30 ± 0,4	
<b>Nieren</b>	50,3 ± 1,6	40,1 ± 1,6	5,10 ± 1,2	
<b>Magen</b>	51,1 ± 1,4	15,2 ± 1,4	4,20 ± 1,2	
<b>Darm</b>	33,4 ± 1,4	14,4 ± 1,4	2,20 ± 1,5	
<b>Schilddrüse</b>	28,1 ± 1,1	28,0 ± 1,7	12,6 ± 1,5	
<b>Leber</b>	60,1 ± 1,4	60,6 ± 1,5	13,1 ± 1,9	
<b>Tumor</b>	21,6 ± 1,1	18,9 ± 1,3	16,7 ± 1,1	<b>WGG008</b>
<b>Muskel</b>	8,40 ± 0,3	4,10 ± 0,9	5,80 ± 0,4	
<b>Blut</b>	35,7 ± 1,9	22,5 ± 1,7	20,4 ± 1,5	
<b>Herz</b>	39,5 ± 1,3	21,1 ± 1,6	19,8 ± 1,4	
<b>Milz</b>	35,2 ± 1,9	40,1 ± 1,3	25,3 ± 1,2	
<b>Nieren</b>	53,0 ± 1,2	42,6 ± 1,5	16,2 ± 1,1	
<b>Magen</b>	52,5 ± 1,2	16,7 ± 1,1	12,8 ± 1,6	
<b>Darm</b>	31,1 ± 1,6	14,9 ± 0,8	13,6 ± 1,9	
<b>Schilddrüse</b>	34,1 ± 1,8	31,0 ± 1,6	23,0 ± 3,7	
<b>Leber</b>	60,6 ± 1,8	60,1 ± 2,7	34,6 ± 1,8	
<b>Tumor</b>	16,0 ± 0,9	14,4 ± 1,8	14,8 ± 1,2	<b>WGG1/1-D3</b>
<b>Muskel</b>	9,20 ± 0,7	4,2 ± 0,6	2,4 ± 0,6	
<b>Blut</b>	36,3 ± 1,6	25,3 ± 1,4	9,7 ± 3,1	
<b>Herz</b>	40,1 ± 1,3	23,7 ± 1,1	9,4 ± 0,8	
<b>Milz</b>	37,2 ± 1,6	40,9 ± 1,4	4,6 ± 1,1	
<b>Nieren</b>	53,5 ± 1,3	43,4 ± 0,6	5,5 ± 0,3	
<b>Magen</b>	54,7 ± 1,4	18,5 ± 1,3	2,1 ± 1,4	
<b>Darm</b>	32,3 ± 1,7	15,2 ± 0,9	2,4 ± 1,5	
<b>Schilddrüse</b>	36,7 ± 1,6	33,3 ± 0,8	14,2 ± 0,8	
<b>Leber</b>	63,4 ± 1,2	61,9 ± 0,9	14,3 ± 1,1	
<b>Tumor</b>	17,7 ± 1,2	15,9 ± 0,9	15,0 ± 0,9	<b>WGGD4-B4</b>
<b>Muskel</b>	9,60 ± 0,8	4,80 ± 0,2	6,40 ± 1,5	
<b>Blut</b>	34,3 ± 1,7	22,1 ± 1,6	14,3 ± 1,3	
<b>Herz</b>	39,6 ± 1,3	23,6 ± 1,2	13,1 ± 0,9	
<b>Milz</b>	35,2 ± 1,9	40,8 ± 1,4	7,30 ± 0,7	
<b>Nieren</b>	55,7 ± 0,5	43,3 ± 0,6	5,40 ± 0,3	
<b>Magen</b>	56,9 ± 1,5	18,1 ± 1,2	8,00 ± 0,8	
<b>Darm</b>	36,1 ± 1,0	15,0 ± 0,9	9,90 ± 0,1	

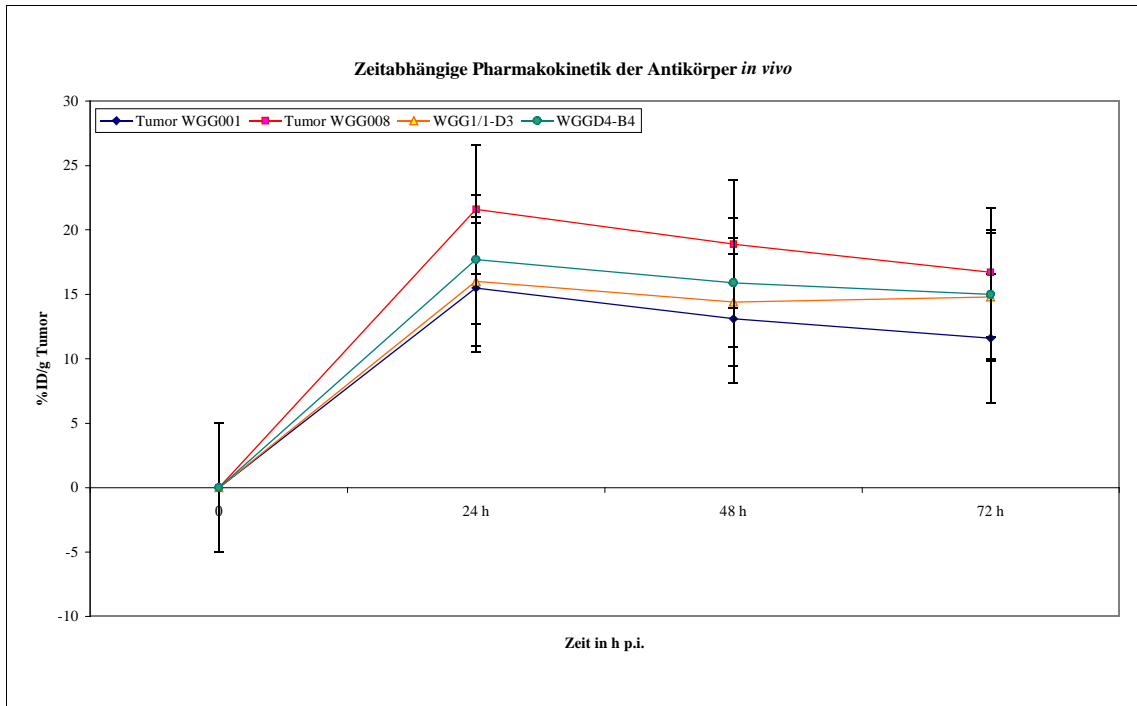


Abbildung 3.26: Zeitabhängige Verteilung der [ $^{123}\text{I}$ ]Iod konjugierte Antikörper: WGG001, WGG008, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4

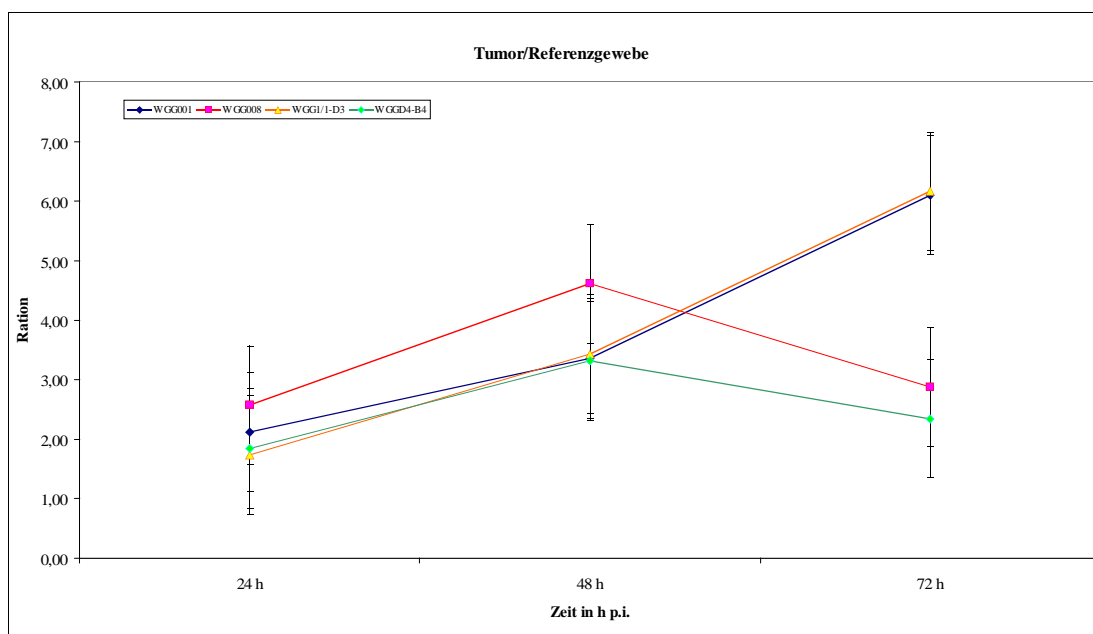


Abbildung 3.27: Zeitabhängige Verteilung der [ $^{123}\text{I}$ ]Iod konjugierten Antikörper: WGG001, WGG008, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4: dargestellt als Verhältniss Tumor zu Nicht-Tumor (hier Muskel).

Die hohe Anreicherung und der lange Verbleib am Tumor lässt jedoch auf eine gute *in vivo* Avidität der neuen Antikörper schließen (Abb. 3.26), wobei sich die mAk WGG008 und WGGD4-B4 als die mit der höchsten Anreicherung (15%ID/g Tumor) auch noch nach 72 h erwiesen haben (Abb. 3.26). Die Verhältnisse der Anreicherungen Tumor/ Referenzgewebe sind nach 72 h für die beiden mAk WGG001 und WGG1/1-D3 höher und liegen bei ca. 6.

Für eine mögliche Therapie ist es wichtig, dass der mAk rasch sein Epitop findet, am Tumor verbleibt (72 h ist dabei mindestens wünschenswert) und anschließend den Tumor wieder verlässt. Diesen Maßstab scheinen die beiden mAk WGG008 und WGGD4-B4 auf alle Fälle aufgrund ihrer *in vivo* Kinetik zu erfüllen.

Die Ergebnisse der Szintigraphie bestätigten die der Biodistribution. Abb. 3.28 und 3.29 zeigen beispielhaft die zeitabhängige Verteilung der Radioiodmarkierten mAk WGGD4-B4 bzw. WGG008 in mit U87-Gliom xenotransplantierten SCID-Mäusen. Die bereits diskutierten hohen unerwünschten spezifischen Anreicherungen in den inneren Organen (Leber, Magen, Darm) sind neben der Anreicherung im Tumor gut darstellbar.

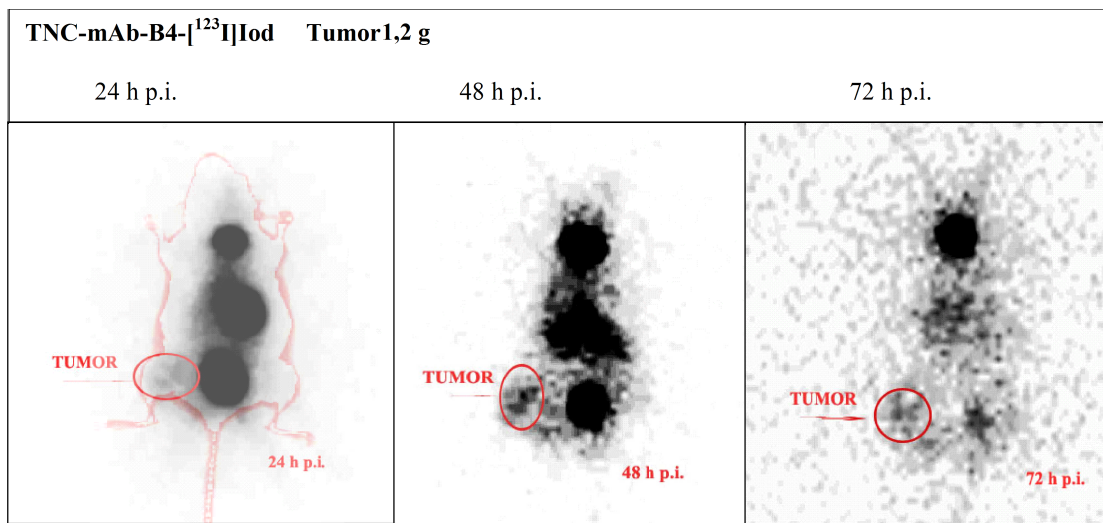


Abbildung 3.28: Szintigramm einer U87-xenotransplantierten SCID-Maus. Verteilung des  $^{123}\text{I}$ Iod-konjugierten Antikörpers WGGD3-B4: 24, 48 und 72 h nach i.v. Injektion von 25 MBq Tracer (40 minütige statisch-planare Aufnahmen, 256x256 Matrix, Zoom 2, Zweikopf Gammakamera, ECAM2, Siemens).

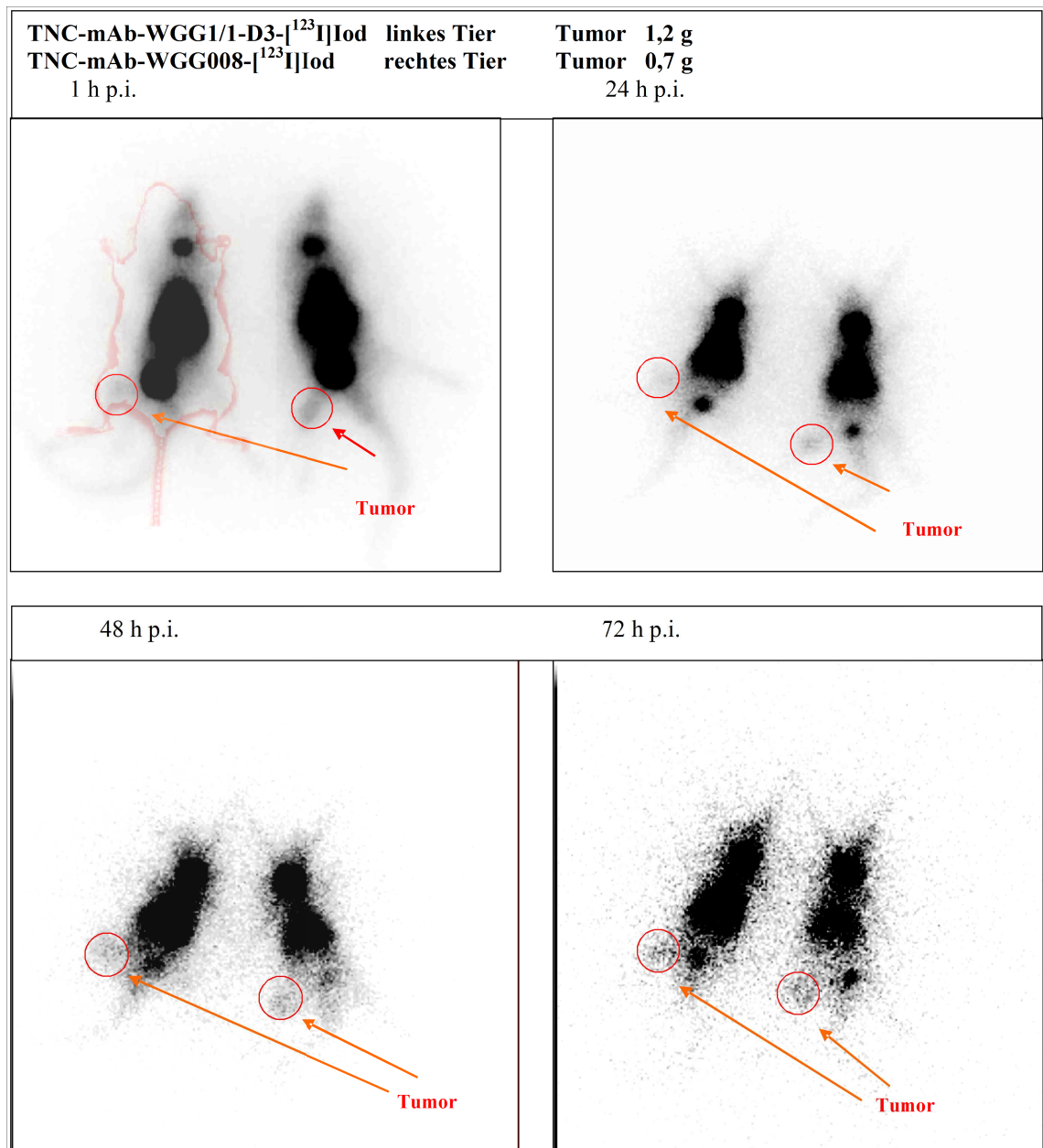


Abbildung 3.29: Szintigramme zweier U87-xenotransplantierten SCID-Mäusen. Verteilung des  $^{123}\text{I}$ Iod-konjugierten Antikörpers WGG1/1-D3 (linkes Tier) und WGG008 (rechtes Tier): 1, 24, 48 und 72 h nach i.v. Injektion von 25 MBq Tracer (40-minütige statisch-planare Aufnahmen, 256x256 Matrix. Zoom 2; Zweikopf-Gammakamera, ECAM2, Siemens).

### 3.5.3 Biodistribution und Biokinetik des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk WGGD4-B4

Die Verteilung des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk WGGD4-B4 wurde analog zu 3.5.2 durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten betrugen in der Regel 45 GBq [ $^{111}\text{In}$ ]Indium/mol Antikörper. Nach Aufreinigung mittels PD 10 Säule betrug die radiochemische Reinheit 99,6%. Die Qualitätskontrolle wurde mittels Radio-Dünnschichtchromatographie (ITLC-SG, Laufmittel: 0,9% NaCl) und Auslesen am Radiodetektor: MiniGITA, Fa. Raytest durchgeführt (Abb. 3.30).

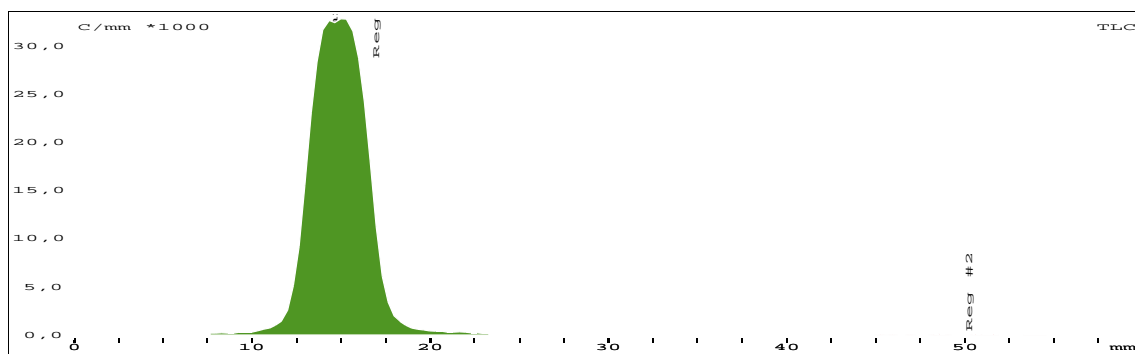


Abbildung 3.30: Qualitätskontrolle des Radionuklid [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA-konjugierten WGGD4-B4: Substanzfleck 1 (grün): [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA-konjugierten WGGD4-B4 ( $R_f = 0$ ), Substanzfleck 2 (Reg #2): nicht Protein gebundenes [ $^{111}\text{In}$ ]Indium ( $R_f = 0,8 - 1,0$ ). ITLC-SG, Laufmittel: 0,9% NaCl und Auslesung mit Radioaktivitätsdetektor: Raytest MiniGITA, Fa. Raytest.

Die Anreicherung von freier bzw. abgespaltener Aktivität war mit diesem Radiomarkierten mAk entsprechend den Erwartungen gering. In Maus existiert kein Stoffwechselvorgang, der [ $^{111}\text{In}$ ]Indium bzw. [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA vom mAk abspaltet. Diese Versuche dienten der Verdeutlichung, dass die unerwünschte spezifische Anreicherung des mit dem [ $^{123}\text{I}$ ]Iod markierten WGGD4-B4 an den Organen Leber, Schilddrüse und Magen-Darm-Trakt nicht aufgrund der Kreuzreaktivität der mAk *in vivo* zustande kam, sondern auf die Dehalogenierung der mAk's in Maus zurückzuführen ist und dass der Iodmarkierte mAk nur bedingt geeignet für die Evaluierung von Biodistributionsdaten in SCID-Mäusen ist. Der hier getestete Antikörper WGGD4-B4 zeigte eine Konzentrationssteigerung am Tumor bis zu 72 h p.i. mit einer mittleren Anreicherung von 11% der ID/g Tumor (Tab. 3.6; Abb. 3.31). Für eine anschließend langsame Dissoziation vom Zielantigen und somit vom Tumor, sprechen die hier gemessenen Werte bis zu 120 h p.i. Zu diesem letzten gemessenen Zeitpunkt sind immer noch ca. 9% der injizierten Dosis am Tumor wiederzufinden. Die Biodistribution in den Referenzorganen Muskel, Magen und Darm bleiben zu jedem gemessenen Zeitpunkt niedrig,

## Ergebnisse

Tabelle 3.6: Biodistributionsdaten des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk WGGD4-B4. Aktivitätsmengen als % ID/g (injizierte Dosis/Gramm Gewebe) bzw. die pro Tiergruppe ermittelten arithmetische Mittel in den Organen: Tumor, Muskel, Blut, Herz, Nieren, Darm, Magen, und Leber. (Gemessen im Gammacounter)

Gewebe	2 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	72 h p.i.	96 h p.i.	120 h p.i.
<b>Tumor</b>	2,50±0,44	4,52±1,33	6,53±1,98	11,08±2,77	9,75±1,78	8,99±2,29
<b>Muskelgewebe</b>	1,20±0,64	1,35±0,07	1,64±0,04	1,20±0,06	1,64±0,08	0,71±0,01
<b>Blut</b>	16,87±1,88	9,01±1,02	6,29±0,33	1,64±0,04	1,50±0,01	1,20±0,11
<b>Herz</b>	16,90±2,01	9,32±1,01	6,42±0,41	1,34±0,03	1,54±0,11	1,18±0,06
<b>Niere</b>	12,00±1,40	11,77±2,21	11,00±1,56	8,90±1,22	7,81±1,56	6,05±0,55
<b>Magen</b>	2,35±0,23	2,85±2,53	3,65±0,07	1,40±0,02	2,35±0,49	0,73±0,03
<b>Darm</b>	2,89±0,31	2,35±0,7	1,37±0,01	1,70±0,05	2,55±1,21	0,90±0,01
<b>Leber</b>	7,00±1,26	9,00±0,99	11,60±1,67	12,10±2,98	13,40±1,78	5,50±0,65

somit bindet dieser Antikörper spezifisch am Tumor und zeigte keine spezifische Anreicherung an den zuletzt genannten Organen. Muskel, das Nichttumor Referenzorgan, weist durchwegs eine niedrige Dosis von maximal 1,65% der ID/g Muskelgewebe auf (Tab. 3.6; Abb. 3.31). Die steigenden Verhältnisse von Tumor zu Referenzgewebe an all diesen Organen zeigten auf, dass der unspezifische kleine Anteil des Antikörpers an diesen Organen nicht auf eine Antigenbindung zurückzuführen ist (Abb. 3.32). Der Abbau des radioaktiv konjugierten mAk stieg in der Leber stetig an (96 h p.i: 13,4%ID/g Leber), um dann nach 120 h p.i einen Wert von nur noch 5,5% ID/g Leber aufzuweisen. Sobald der Tracer zum größten Teil aus dem Blutpool verschwindet, sanken auch die an der Leber gemessenen Werte. Die Ausscheidung des dissoziierenden bzw. nicht gebundenen mAk über die Nieren war anfangs mit Werten um die 12% ID/g Niere relativ hoch, sank jedoch ebenfalls sobald der Tracer aus dem Blut entfernt wurde. Die mit dem [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk WGGD4-B4 evaluierten Biodistributionsdaten zeigten, dass dieser derart konjugierte mAk mit hoher Spezifität sein Zielantigen am Tumor findet und eine geringe unspezifische Anreicherung an den Referenzorganen zeigte. Der mAk weist eine langsame Anreicherung am Tumor auf, die aber im erwarteten Rahmen für einen mAk liegt. Die lange Verweildauer bzw. die langsame Dissoziation vom Tumor weisen auf eine hohe Avidität und eine relativ langsame Verstoffwechslung dieses mAk hin. Dieser mAk bindet über mehrere Tage hinweg stabil an sein TAA, das vorher *in vitro* evaluierte hTNC-1. Die Szintigramme mit [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugiertem mAk WGGD4-B4 bestätigen, die in der Biodistribution erhobenen Daten. Mit zunehmender Ausscheidung des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk WGGD4-B4 nahm die unspezifische Dosis an den Referenzgeweben ab, der Tumor bleibt auch noch 120 h p.i. sowohl visuell als auch in der Biodistribution detektierbar (Abb. 3.33 und 3.34).

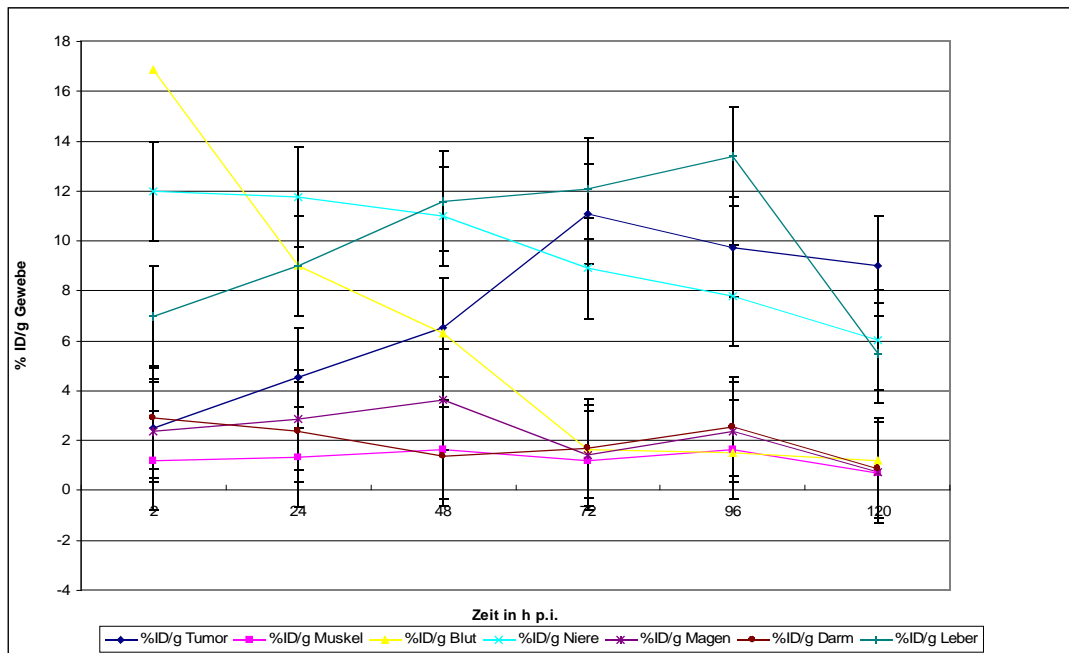


Abbildung 3.31: Zeitabhängige Verteilung des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA-konjugierten mAk: WGGD4-B4 an den Organen: Tumor, Muskel, Blut, Niere, Magen, Darm, Leber

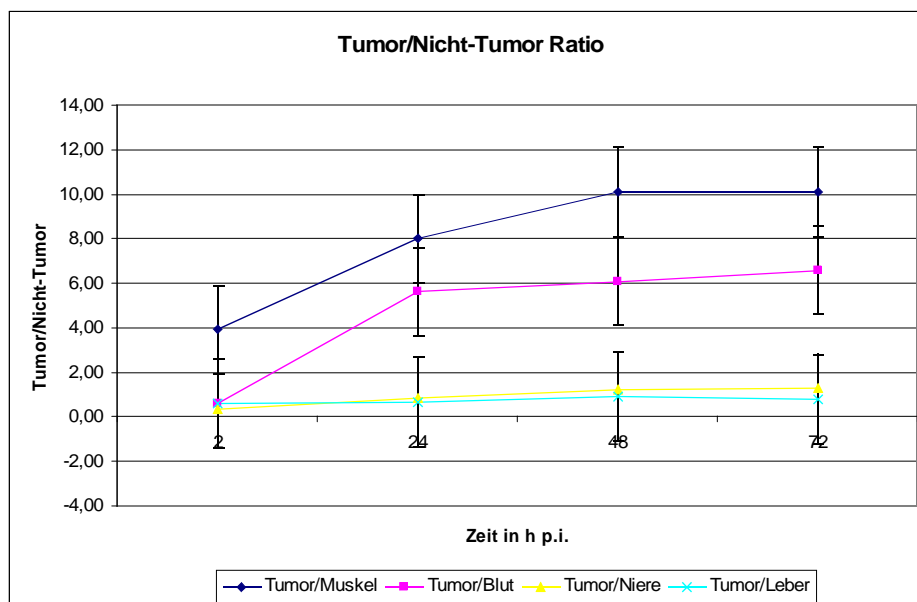


Abbildung 3.32: Zeitabhängiges Tumor zu Nicht-Tumor Verhältnis: In der Leber findet zeitabhängig der Abbau des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk WGGD4-B4 statt; das Tumor zu Niere Verhältniss steigt in Abhängigkeit v. d. Zeit relativ konstant an, da hier eine vermehrte Ausscheidung des dissoziierenden [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk WGGD4-B4 stattfindet; die Verhältnisse Tumor/Blut und Tumor/Muskel steigen bis zu 48h p.i. deutlich an.

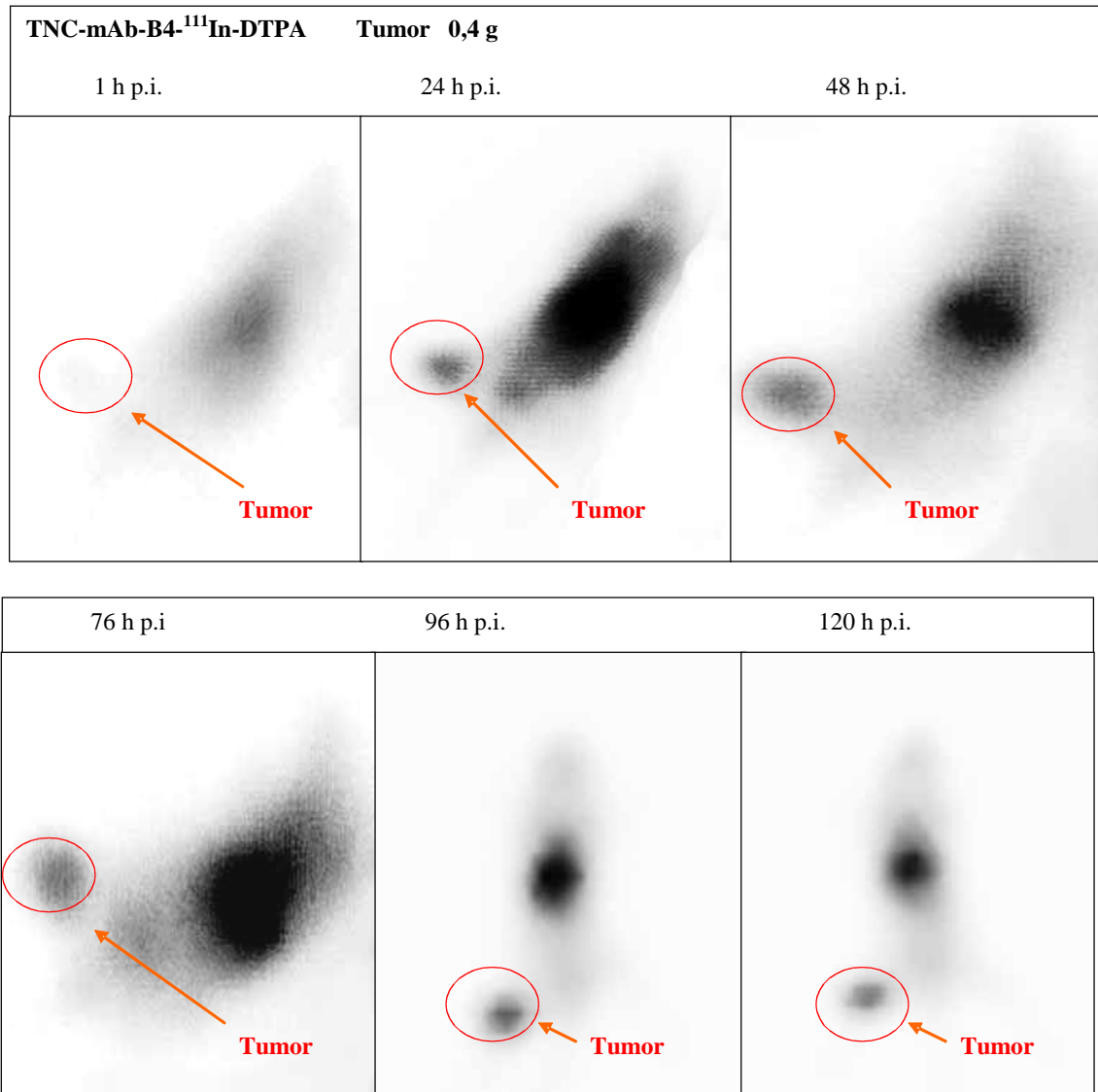


Abbildung 3.33: Statisch-planare Aufnahmen an U87 xenotransplantierten SCID/weiblich 2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h nach i.v. Injektion von 25 MBq [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA-konj.-mAb-WGGD4-B4: die Tiere wurden mit 1,2% Isofluran/1,6% O<sub>2</sub> anästhesiert und für 30' aufgenommen; dorsale Aufsicht/Kopf oben; Tumor ist rot eingekreist und befindet sich an der linken hinteren Flanke (Matrix: 256x256, Zoom 1, Zweikopfgamma-Kamera, Symbia, Siemens).



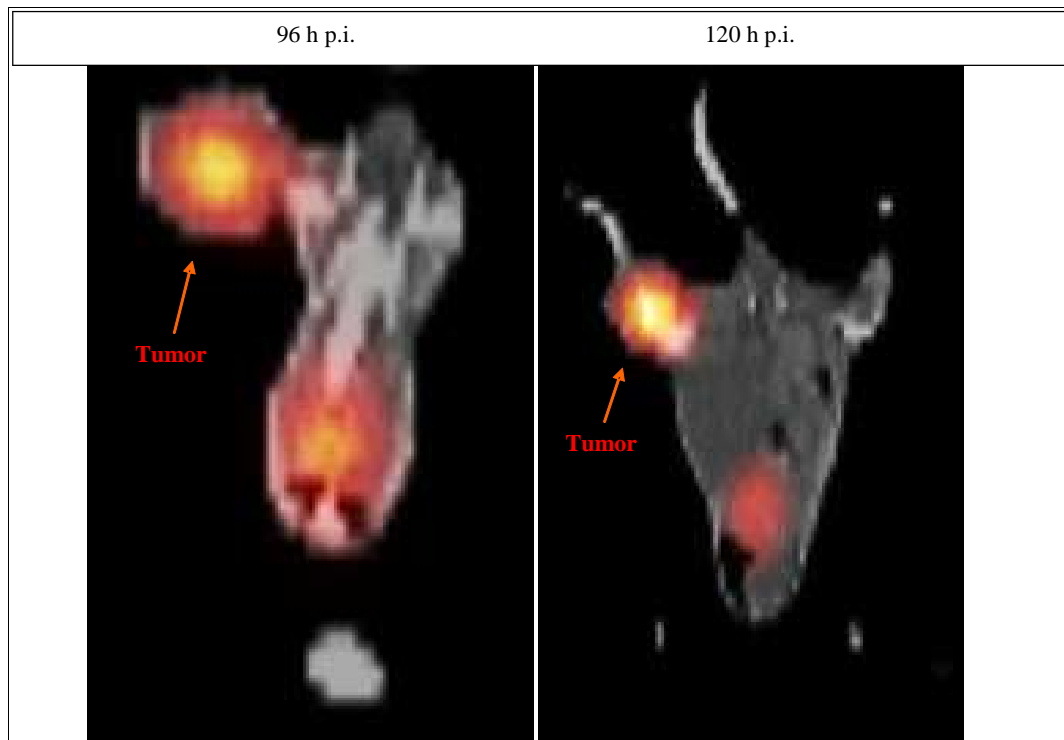


Abbildung 3.34: SPECT-CT Aufnahmen an U87 xenotransplantierten SCID/weiblich 96 h und 120 h nach i.v. Injektion von 25 MBq [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA-konj.-mAk-WGGD4-B4: die Tiere wurden mit 1,2% Isofluran/1,6%  $\text{O}_2$  anästhesiert und für 40' aufgenommen; dorsale Aufsicht/Kopf unten; Tumor befindet sich an der rechten hinteren Flanke (Matrix: 128er; ME Kolimator; Zweikopfgamma-Kamera, Symbia, Siemens)

### 3.5.4 Biodistribution und Biokinetik des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA-konjugierten mAk BC-24

Die Verteilung des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk BC-24 (Fa. Sigma-Aldrich) wurde analog zu 2.5.3 durchgeführt.

Die spezifischen Aktivitäten betrugen in der Regel 140-150 MBq [ $^{111}\text{In}$ ]Indium/500  $\mu\text{g}$  Antikörper. Nach Aufreinigung mittels PD 10 Säule betrug die radiochemische Reinheit ca. 99%. Die Qualitätskontrolle wurde mittels Dünnschichtchromatographie (ITLC-SG, Laufmittel: 0,9% NaCl) und Auslesen am Radiodetektor: MiniGITA, Fa. Raytest durchgeführt (Abb. 3.35).

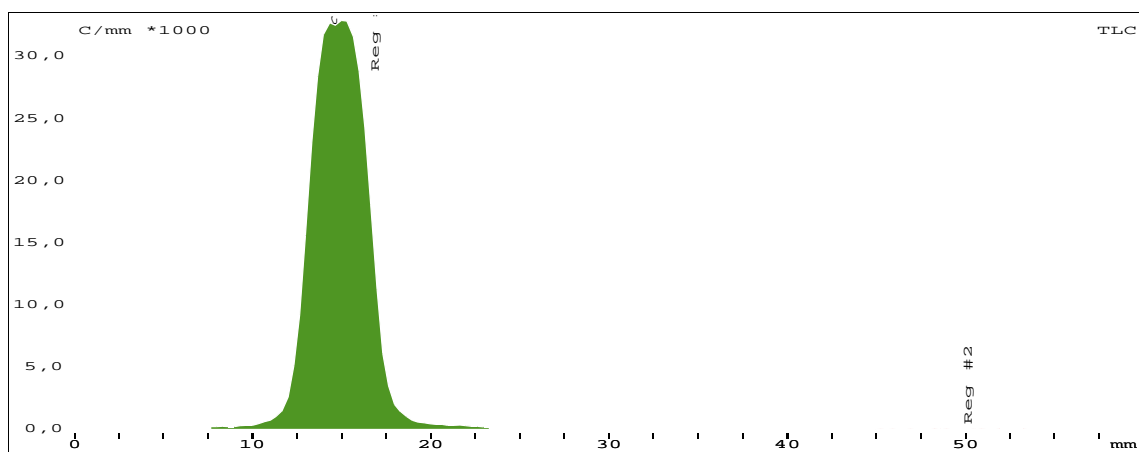


Abbildung 3.35: Qualitätskontrolle des Radionuklid [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA-konjugierten BC-24: Substanzfleck 1 (grün): [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA-konjugierten BC-24 ( $R_f = 0$ ), Substanzfleck 2 (Reg #2): nicht Protein gebundenes [ $^{111}\text{In}$ ]Indium ( $R_f = 0,8-1,0$ ). ITLC-SG, Laufmittel: 0,9% NaCl und Auslesung mit Radioaktivitätsdetektor: Raytest MiniGITA, Fa. Raytest.

Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug 2-3 Tiere. Die mit diesen Tieren erhobenen Biodistributionsdaten sollten mit weiteren 2-3 Tieren pro Gruppe bestätigt werden. Die unspezifische Anreicherung war mit diesem Tracer entsprechend den Erwartungen gering. Verglichen mit dem mAk WGGD4-B4 war die unspezifische Anreicherung des BC-24 jedoch höher. Der hier getestete monoklonale Antikörper BC-24 zeigte eine Konzentrationssteigerung am Tumor bis zu 24 h p.i. mit einer mittleren Anreicherungen von 11,08% der ID/g Tumor (Tab. 3.7; Abb. 3.36). Dieser mAk dissoziierte schneller vom Zielantigen und somit vom Tumor als der mAk WGGD4-B4: 72 h p.i sind mit WGGD4-B4 noch ca 11%ID/g Tumor detektierbar, wohin gegen mit dem mAk BC-24 nur noch ca. 8% der ID/g Tumor nachweisbar waren.

Tabelle 3.7: Biodistributionsdaten des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk BC-24. Aktivitätsmengen als % ID/g (injizierte Dosis/Gramm Gewebe) bzw. die pro Tiergruppe ermittelten arithmetische Mittel in den Organen: Tumor, Muskel, Blut, Herz, Milz, Nieren, Darm, Magen, Schilddrüse und Leber (gemessen im Gamma-counter).

Gewebe	2 h p.i.	24 h p.i.	48 h p.i.	72 h p.i.
Tumor	2,49±0,4	13,00±0,7	7,82±1,99	7,89±2,4
Muskelgewebe	1,17±0,03	1,90±0,01	1,13±0,05	1,09±0,01
Blut	16,88±2,7	12,25±0,43	8,44±0,2	5,13±0,03
Herz	11,10±1,89	7,72±0,56	4,39±0,12	2,60±0,04
Milz	16,68±2,3	10,51±1,76	7,33±0,41	5,35±1,2
Niere	8,50±1,33	7,29±1,03	4,95±1,66	3,56±1,04
Magen	2,35±0,78	2,05±0,07	1,41±0,9	1,17±0,04
Darm	2,90±1,92	2,60±0,08	1,59±1,32	1,13±0,06
Schilddrüse	3,05±1,43	5,17±1,02	3,70±1,0	3,38±1,0
Leber	12,50±2,55	9,23±2,2	5,86±0,6	4,21±1,2

Die Biodistribution in den Referenzorganen Muskel, Magen und Darm blieben zu jedem gemessenen Zeitpunkt niedrig. Die Werte waren jedoch gegenüber dem WGGD4-B4 um ca. 1-2% erhöht.

Der Abbau des radioaktiv konjugierten mAk sinkt in der Leber stetig ab (72 h p.i.: ca. 4% ID/g Leber). Zu Beginn der Biodistributionsstudie (zum Zeitpunkt 2 h) wurden bereits 12 % der ID/g Leber detektiert, was einen raschen Abbau des Immunkonjugates an der Leber bedeutet und auf eine geringere *in vivo* Plasmastabilität hindeutet (verglichen mit WGGD4-B4). Die Ausscheidung des dissoziierenden bzw. nicht gebundenen mAk über die Nieren war anfangs mit Werten um die 12% ID/g Niere relativ hoch, sinkt jedoch ebenfalls mit der Elimination aus dem Blutpool (Abb 3.36). Die mit dem [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk BC-24 evaluierten Biodistributionsdaten entsprechen einer zu erwartenden Kinetik für einen mAk, der mit hoher Spezifität, jedoch mit einer schnelleren Dissoziationrate am Tumor bindet. Die SPECT-CT Aufnahmen mit [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk BC-24 bestätigen die in der Biodistribution erhobenen Daten. Mit zunehmender Ausscheidung des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk BC-24 nahm die Aktivitätsmenge am Tumor und an den Referenzgeweben ab, der Tumor bleibt jedoch bis zu 72 h p.i. detektierbar (Abb. 3.38).

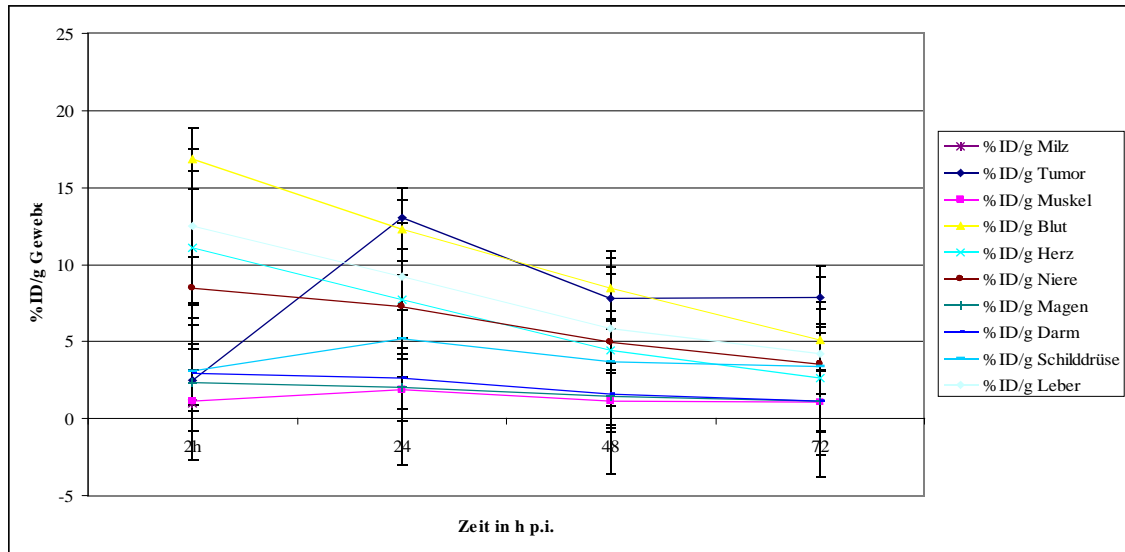


Abbildung 3.36: Zeitabhängige Verteilung des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA-konjugierten mAk: BC-24 an den Organen: Tumor, Muskel, Blut, Herz, Milz, Niere, Magen, Darm, Schilddrüse, Leber

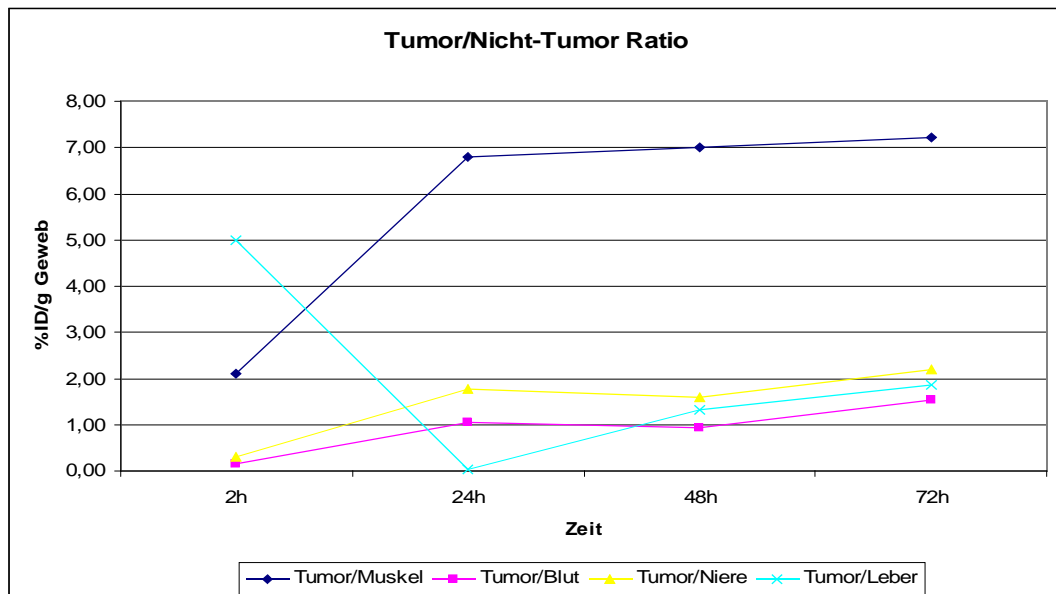


Abbildung 3.37: Zeitabhängiges Tumor zu Nichttumor Verhältnis: In der Leber findet zeitabhängig der Abbau des [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk BC-24 statt; ebenso steigen die Tumor zu Niere Verhältnisse nicht merklich in Abh. v. d. Zeit, weil hier eine vermehrte Ausscheidung des dissoziierenden [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten mAk BC-24 stattfindet; An Muskel und im Blut findet sich in Abhängigkeit von der Zeit immer weniger [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierter mAk BC-24, wohingegen der Anteil spezifisch gebundener mAk am Tumor gleich bleibt.

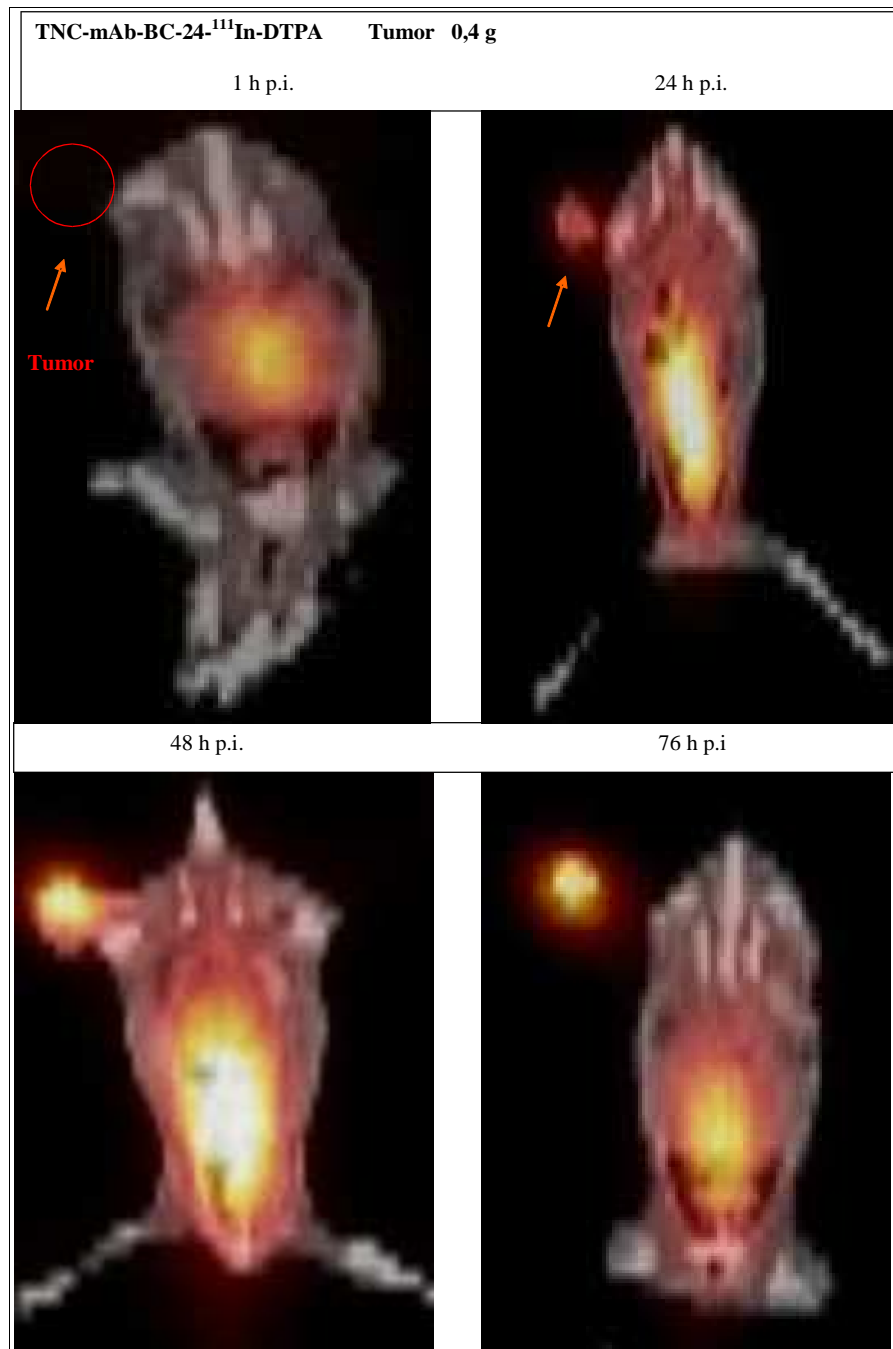


Abbildung 3.38: SPECT-CT Aufnahmen an U87 xenotransplantierten SCID/weiblich 1 h, 24 h, 48 h und 72 h nach i.v. Injektion von 25 MBq [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA-konj.-mAb-BC-24: die Tiere wurden mit 1,2% Isofluran/1,6% O<sub>2</sub> anästhesiert und für 40' aufgenommen; dorsale Aufsicht/Kopf unten; Tumor befindet sich an der rechten hinteren Flanke (Matrix: 128er; ME Kolimator; Zweikopfgamma-Kamera, Symbia, Siemens).

### 3.6 Gentechnische Herstellung *h*TNC-1 spezifischer Fab-Fragmente

Die neuen mAk stellten sich in den *in vitro* als auch in den *in vivo* Tests gegenüber ihrem Target dem *h*TNC-1 als spezifisch dar. Sie zeigten eine hohe Anreicherung und damit ihre potenzielle Eignung für eine Therapie. Um zusätzlich Tracer mit einer raschen Pharmakokinetik zu erhalten, sollten im Rahmen dieser Arbeit Fab-Fragmente mit den gleichen Antigenbindestellen gentechnisch erzeugt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gensequenzen für die variablen Domänen des murinen monoklonalen Antikörpers WGGD4-B4 in den Expressionsvektor pASK85-D1.3 kloniert. Dieser ermöglichte die Produktion des Fab-Fragmentes Fab-B4 mit murinen konstanten und murinen variablen Domänen. Am C-Terminus der leichten Immunglobulinkette befand sich das His-tag-Affinitätsanhängsel. Das Fab-Fragment konnte in *E. coli* im 2 l-Maßstab mit Ausbeuten von ca. 400 µg produziert werden.

Zur näheren Charakterisierung der Bindungseigenschaften des rekombinanten Fab-Fragmentes wurde die Bindungsaffinität des Fab-Fragmentes B4 neben IHC- und Western Blot Analysen durchgeführt. Des weiteren wurde dieses Fab-Fragment mit [<sup>111</sup>In]Indium konjugiert und die Biodistribution *in vivo* an U87-xenotransplantierten SCID-Mäusen evaluiert.

#### 3.6.1 Konstruktion des Expressionsvektors pASK85-B4

##### 3.6.1.1 N-terminale Proteinsequenzierung der V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Ketten

Für die gentechnische Herstellung von Fab-Fragmenten wurden die cDNA-Sequenzen der variablen Regionen der V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Ketten benötigt. Die cDNA-Sequenz wurden entweder mit degenerierten Primern in einer PCR von gRNA hergestellt und anschließend durch Sequenzierung bestimmt oder es wurden unmodifizierte genspezifische Primer in einer 5'-RACE-PCR mit anschließender Sequenzierung verwendet. Der erste Schritt zur Herstellung der entsprechenden cDNA-Abschnitte bestand darin, die N-terminalen Proteinsequenz der Ketten zu bestimmen, um den Erhalt der cDNA-Sequenzen der variablen Regionen dieser Antikörper mittels degenerierter Primer zu erleichtern.

Die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Ketten der mAk's WGG001 und WGG008 wurden Protein A gereinigt. Die Antikörpermoleküle wurden anschließend im SDS-PAGE elektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen in Glycin-freiem Puffer aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Anschließend an die Coomassie-Blau-Färbung der Blotts konnten die Proteinbanden der Schweren- und der Leichten-Kette aus dem Blot

herausgeschnitten werden. Diese Proben wurden von der AG Prof. Skerra N-terminal durch den Edman-Abbau sequenziert. Auf diese Weise konnten die N-terminalen Aminosäure-Sequenzen der Leichten Kette der beiden Antikörper WGG001 und -008 (die identisch sind) erhalten werden (Tab. 3.8). Die Schweren-Ketten beider mAk waren N-terminal blockiert und konnten auch durch eine Deblockierung mit Pyroglutamat-Aminopeptidase (zu 75% sind Antikörper-Ketten N-terminal mit Pyroglutamat blockiert) nicht erfolgreich sequenziert werden, da diese Ketten anders geblockt zu sein schienen (Tab. 3.8). Auch durch hochauflösende MS-Analysen nach Proteaseverdau (Trypsin und Chymotrypsin) in vier langen LC-MS-FTICR-Massenspektrometrischen Reaktionen konnten die N-terminalen Sequenzen dieser Ketten nicht analysiert werden (durchgeführt von der Fa. Proteomfactory, Berlin).

Tabelle 3.8: Ergebnisse der N-terminalen Proteinsequenzierung (Edman-Abbau)

LC-WGG001	DVVMTQTPLSLPVXLG
LC-WGG008	DVVMTQTPLSLPVXLG
HC-WGG001	N-terminal blockiert
HC-WGG008	N-terminal blockiert

### 3.6.1.2 Selektive Amplifikation der V<sub>L</sub>- und V<sub>H</sub>-Ketten mit degenerierten Primern

Über die N-terminale Proteinsequenzierung konnten keine weiteren Sequenzen der mAk-Ketten gewonnen werden. Zudem erschwerte der degenerierte genetische Code (64 Codonen für 20 Aminosäuren) die Übersetzung der durch die N-terminale Proteinsequenzierung erhaltenen Aminosäuresequenzen in die richtige cDNA-Sequenz. Für die weitere Bestimmung der V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-cDNA-Sequenzen der weiteren hier in dieser Arbeit bereits charakterisierten Hybridomaklone wurden ähnliche degenerierte Primer entwickelt wie die von Schiweck und Wang verwendeten (Schiweck *et al.*, 1997 und Wang *et al.*, 2000). Der Rückwärts-Primer wurde jeweils in die konstante Region der Ketten gelegt. Die Schwere-Kette (HC) wurde mit dem Rückwärts-Primer: 3'-VCH1-IgG3 (genspezifisch) und den Vorwärts-Primern: 5'-VH1, 5'-VH2 und HC-FR1-FW (alle degeneriert) zu amplifizieren versucht, die Leicht-Kette (LC) mit dem Vorwärts-Primer: 5'-VL-1 (degeneriert) und dem Rückwärts-Primer: 3'-CL1 (genspezifisch). Es konnte mit keinem dieser Primer-Paare unter Standard-PCR-Bedingungen und trotz bekannter N-terminaler Proteinsequenz der LC ein spezifisches Produkt amplifiziert werden.

### 3.6.1.3 RT-PCR zur Amplifikation der V<sub>L</sub>- und V<sub>H</sub>-Ketten mit degenerierten/Inosin-Primern

Aufgrund der nicht erfolgreichen PCR's mit rein degenerierten Primer-Paaren unter PCR-Standardbedingungen wurde versucht, einen Teil der degenerierten Basen der Primer aus 3.6.1.2 durch Inosin zu ersetzen. Die reverse Transkription wurde in einem Schritt mit der PCR durchgeführt: RT-PCR (Abb. 3.39). So konnte mit dem Primer-Paar: LC-FR1-FW5'-CL1 die LC der mAk WGG001 und -008 bestimmt werden (Abb. 3.40). Diese sind identisch und sind in den hypervariablen Regionen (CDR1-CDR3) nicht mutiert. Statt der variablen Regionen der Schweren-Kette der Klon WGG001 und -008 wurden lediglich Immunglobulin-Pseudogene amplifiziert (Abb. 3.41).



Abbildung 3.40: RT-PCR und Ethidiumbromid Anfärbung der elektrophoretisch getrennten PCR-Ansätze: Spur 1,12: Längenstandard; 2,4,5: PCR-Ansatz mit WGG001-gRNA (2,4) bzw. WGG008-gRNA (5) und Primer für die Amplifikation der variablen LC; 3: zum Vergleich eine PCR unter Standardbedingungen mit dem gleichen Primer-Paar; 6,7: PCR-Ansatz mit WGG001-gRNA (2,4) bzw. WGG008-gRNA (5) und Primer für die Amplifikation der variablen HC ohne spezifische PCR-Produkte; 8,9,10,11: Positiv- und Negativkontrollen der PCR

```

5' -
GATGTGGTGGTACGCAAACGCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
D V V M T Q T P L S

CTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAACACCTATTTACATTGGTACC
TGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTCTGGG
GTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGT
GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGGCGTTCCG
GTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
-3'

```

Abbildung 3.39: cDNA-Sequenz der VL-WGG001- und -008-Region: fett: Leitsequenz der Leichten-Kette des mAk WGG001 und -008





Sequiserve, Vaterstetten). Die N-terminale-Proteinsequenz dieser Kette lautet: QIQLVQSGPEL (Abb. 3.42). Neben der variablen Sequenz der Schwere-Kette dieses Antikörpers konnte auch ein Teil der Sequenz des 5' UTR (nicht translatierte Region am 5'-Ende) bestimmt werden (Abb. 3.42). Zusätzlich konnte über die CH1-Sequenz der Antikörpertyp mit bestätigt werden. Der Klon WGGD4-B4 sezerniert Antikörper vom Typ IgG3 (konform den Ergebnissen aus 3.4.1).

```

5' -
GACGCGTGGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGAAGCGAGTGACCAGTTAGTCT
TAAGGCACCACTTCTTAGACATCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTACTCTGATGGCAGCT

GCTCAAAGTGCCCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGG
      Q  I  Q  L  V  Q  S  G  P  E  L

AGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACTATGGAATGAACT
GGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACACTGGA
GAGCCAACATATGCCGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAG
CACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAA
GAGAGAATTACTACGGTAGTAGCCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTC
TCTGCAGCTACAACAACAGCCCCATCTGTCTATCCCTTGGTCCCTGGCTGCAGTGACACATC
TGGATCCTCGGTGACACTGGGATGCCTTGTCAAAGGCTACTTCCCTGAGCCGGTAACTGTAA
AATGGAATATGGAGCCCTGTCCAAA
      - 3'

```

Abbildung 3.42: cDNA-Sequenz der V<sub>H</sub>-WGGD4-B4-Region: rot: 5'UTR; unterstrichen: Start-ATG; fett: Leitsequenz der schweren Kette des mAk WGGD4-B4

Für die Amplifikation der V<sub>L</sub>-Kette der mAk WGGD4-B4 wurde ebenfalls mit genspezifischen Primern am Rückwärtsstrang gearbeitet. Hierfür wurden ebenfalls die Datenbanken: IMGT (the international ImMunoGeneTics information system) und Abysis (Analyse Amino Acid Distributions at a specific points of immunoglobulins) verwendet. Mit dem ersten GSP1-Oligo für die V<sub>L</sub>-Kette (GSP1\_LC1(X00915: V39-45)) konnte die Synthese des ersten cDNA-Stranges durchgeführt werden. Anschließend konnte mit Erfolg der zweite cDNA-Strang für diesen Klon und die V<sub>L</sub>-Kette synthetisiert werden. Um die Menge an PCR-Produkt zu erhöhen, mussten hier zwei aufeinander folgende und jeweils Nested-PCR's durchgeführt werden. Hierzu wurden zwei Primerpaare entwickelt, welche sowohl am Vorwärts- als auch am Rückwärtsstrang spezifisch binden. Der Reverse-Primer GSP2 (GSP\_LC2(X00915:V21-28)) ist ein sogenannter Nested-Primer, der in der cDNA-Sequenz vor dem GSP1 spezifisch bindet. Der Reverse-Primer GSP3 (GSP\_LC3(X00915:P2-P9)) ist ebenfalls ein Nested-Primer, der in der cDNA-Sequenz vor dem GSP2 spezifisch bindet. Die cDNA-Sequenz

der V<sub>L</sub>-WGGD4-B4 wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 der Fa. Invitrogen ligiert und sequenziert (Fa. Sequiserve, Vaterstetten). Die N-terminale-Proteinsequenz dieser Kette lautet: DVQITQSPSY (Abb. 3.43). Neben der variablen Sequenz der Leichten-Kette dieses Antikörpers konnte auch ein Teil der Sequenz des 5' UTR (nicht translatierte Region am 5'-Ende) bestimmt werden (Abb. 3.43).

```

5' -
TATATCCAGTGCAGCAATCAGTTCCTGCCAGGACACAGTTTAGATATGAGGTTCCAGGTTCA
GGTTCTGGGGCTCCTTCTGCTCTGGATATCAGGTGCCAGTGTGATGTTCCAGATAACCCAGT
                                     D V Q I T Q

CTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCATTTCTATTAATTGCAGGGCAAGTAAG
  S P S Y

AGCATTAGCAAATATTTAGCCTGGTATCAAGCGAAACCTGGGAAAATAATAAGCTTCTTAT
CTACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGAATTCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTA
CAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAA
CAACATAATGAATACCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGA
TGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCT
CAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTCAAGGGCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAG
TGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGT
                                     -3'

```

Abbildung 3.43: cDNA-Sequenz der VL-WGGD4-B4-Region: rot: 5'UTR; unterstrichen: Start-ATG; fett: Leitsequenz der leichten Kette des mAk WGGD4-B4

### 3.6.1.5 Sequenz- und Datenbankanalysen der V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Regionen

Alle bisher bestimmten V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-cDNA-Sequenzen wurden mit bekannten Immunglobulinsequenzen der Datenbank VBASE2 verglichen. Mit den Tools dieser Datenbank wurde ein Sequenzalignment mit allen bekannten Immunglobulin-Keimbahngenenen durchgeführt. Die Analyse der V<sub>H</sub> des mAk WGGD4-B4 ist der Keimbahngen-Familie VHGM3.8 am ähnlichsten. Das Tool „DNAPlot“ dieser Datenbank prüft zuerst, ob keine Fehler im Leserahmen vorhanden sind und ob Mutationen entstanden sind, die zur Verschiebung der Position der beiden hochkonservierten Cystein-Reste in der V<sub>H</sub>-Domäne führen könnten. Beide Parameter sind für die V<sub>H</sub> des mAk WGGD4-B4 korrekt (Abb. 3.44). Des weiteren sind die Positionen der Framework-Regionen (FR1 - 2) und die hypervariablen Regionen (CDR1 - 2, complementarity determining region) ebenfalls nicht variabel und befinden sich wie bei der Keimbahngen-Familie an definierten Stellen (Abb. 3.44).

## Ergebnisse

Region	Position (bp)	Region	Position (bp)	Region	Position (bp)
FR1	1..75	CDR1	76..99	1st_CYS	64..66
FR2	100..150	CDR2	151..174	CONSERVE D_TRP	106..108
FR3	175..288	CDR3	289..>294	2nd_CYS	286..288

Abbildung 3.44: Position der Regionen FR1-3 und CDR1-3 und der beiden konservierten Cysteine der variablen Domäne der murinen Keimbahngenfamilie VH<sub>GAM3.8</sub> (VBASE2, DNAPlot)

S	T	R	G	H	A	S	T	S	T	G	G	G	E	A	S	D	Q	L	V	L	R	H	H	F	L	D	I	
M	A	W	V	W	T	L	L	L	L	M	A	A	A	Q	S	A	Q	A										
Q	I	Q	L	V	Q	S	G	P	E	L	K	K	P	G	E	T	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	T	F
T	N	Y	G	M	N	W	V	K	Q	A	P	G	K	G	L	K	W	M	G	W	I	N	T	Y	T	G	E	P
T	Y	A	D	D	F	K	G	R	F	A	F	S	L	E	T	S	A	S	T	A	Y	L	Q	I	N	N	L	K
N	E	D	T	A	T	Y	F	C	A	R	E	N	Y	Y	G	S	S	P	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V
T	V	S	A	A	T	T	T	A	P	S	V	Y	P	L	V	P	G	C	S	D	T	S	G	S	S	V	T	L
G	C	L	V	K	G	Y	F	P	E	P	V	T	V	K	W	N	Y	G	A	L	S							

Abbildung 3.45: Analyse der Aminosäuresequenz der V<sub>H</sub>-WGGD4-B4 (kloniert in den pCR2.1). Rot: Leitsequenz; unterschrieben: CDR's; blau: CH1-Region; grau: mutierte Sequenz der CDR's (VBASE2, DNAPlot)

Die Aminosäuresequenz der CDR's ist stark mutiert, was auf eine gute somatische Reifung dieses Antikörpers während der Immunisierung hindeutet (laut Abgleich gegen die Proteindatenbank blastp: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Abb. 3.45).

Ähnlich wurde bei der Analyse der V<sub>L</sub>-Domäne des mAk WGGD4-B4 vorgegangen. Die Keimbahngenfamilie der diese variable Domäne am ähnlichsten ist, ist die Igk-V1 Familie. Ebenso wurde hier mittels DNAPlot der Datenbank geprüft, ob keine Fehler im Leserahmen vorhanden sind und ob Mutationen entstanden sind, die zur Verschiebung der Position der beiden hochkonservierten Cystein-Reste in der V<sub>L</sub>-Domäne führen könnten. Beide Parameter sind für die V<sub>L</sub> des mAk WGGD4-B4 korrekt (Abb. 3.46, 3.47). Des weiteren sind die Positionen der FR1 – 2 Regionen und die hypervariablen Regionen CDR1 bis 3 Regionen durch die Zugehörigkeit zur entsprechenden Keimbahngenfamilie an definierten Stellen (Abb. 3.46, 3.47). Die Aminosäuresequenz der CDR's ist auch in der LC stark mutiert, was auf eine gute somatische Reifung dieser Antikörperkette während der Immunisierung hindeutet (laut Abgleich gegen Proteindatenbank blastp: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Region	Position (bp)	Region	Position (bp)	Region	Position (bp)
FR1	1..78	CDR1	79..111	1st_CYS	67..69
FR2	112..162	CDR2	163..171	CONSERVED_TRP	118..120
FR3	172..279	CDR3	280..>297	2nd_CYS	277..279

Abbildung 3.46: Position der Regionen (FR1-3; CDR1-3) und der beiden Cysteine der variablen Domäne der murinen Keimbahnen-Familie Igk-V1 (VBASE2, DNAPlot)

Y	I	Q	C	S	N	Q	F	L	P	G	H	S	L	D	M	R	F	Q	V	Q	V	L	G	L	L	L	L	W	I	S	G	A	Q	C
D	V	Q	I	T	Q	S	P	S	Y	L	A	A	S	P	G	E	T	I	S	I	N	C	R	A	S	K	S	I	S	K	Y	L	A	W
Y	Q	A	K	P	G	K	T	N	K	L	L	I	Y	S	G	S	T	L	Q	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D
F	T	L	T	I	S	S	L	E	P	E	D	F	A	M	Y	Y	C	Q	Q	H	N	E	Y	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E
L	K	R	A	D	A	A	P	T	V	S	I	F	P	P	S	S	E	Q	L	T	S	G	G	A	S	V	V	C	F	L	N	N	F	K
G	E	F	Q	H	T	G	G	R	Y																									

Abbildung 3.47: Analyse der Aminosäuresequenz der V<sub>L</sub>-WGGD4-B4 (kloniert in den Vektor pCR2.1). Rot: Leitsequenz; unterstrichen: CDR's; blau: CH1-Region; grau: mutierte Sequenz der CDR's (VBASE2, DNAPlot)

### 3.6.2 Rekombinante Herstellung des *h*TNC-1 spezifischen Fab-Fragmentes B4

Für die Synthese des Fab-Fragments B4 als Fusionsprotein mit dem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel wurde ausgehend von dem Vektor pASK85-D1.3 (Skerra & Plückthun, 1988) der Expressionvektor pASK85-B4 konstruiert. Die auf diesen pASK-Vektoren vorhandenen singulären und standardisierten Restriktionsschnittstellen ermöglichten den einfachen Austausch der Gensequenzen von Immunglobulindomänen. Mittels den Restriktionsenzyme PstI und BstEII wurde aus dem Plasmid pASK85-D1.3 die Gensequenz für die *murine* variable Domäne der schweren Immunglobulinkette herausgeschnitten und dafür die durch die gleichen Restriktionsenzymen behandelte *murine* V<sub>H</sub>-Domäne des mAk WGGD4-B4 in den Vektor ligiert. Um die entsprechenden Schnittstellen an die cDNA-Sequenz der V<sub>H</sub>-Domäne zu implementieren, wurden Primer entwickelt, die Mutationen an den Enden dieser Domäne einführen (von 21 bp sind max. drei Tripletts an jeweils einer Base verändert).

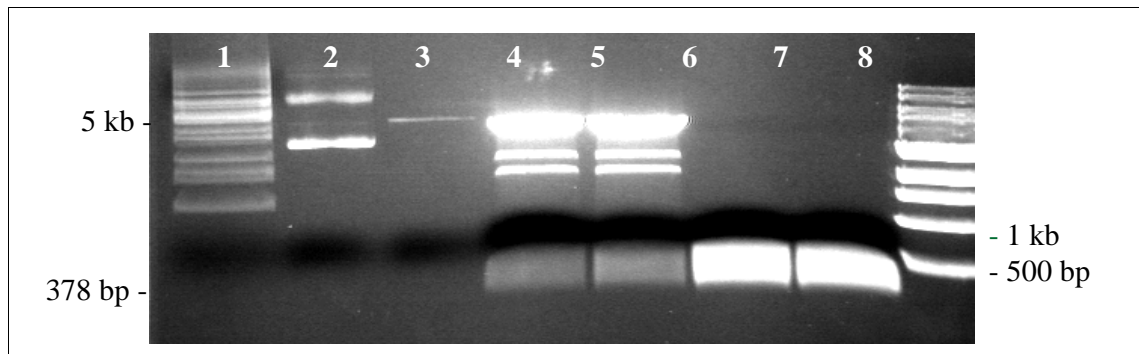


Abbildung 3.48: Ligation der  $V_H$ -Domäne des mAk WGGD4-B4 in den Vektor pASK85-D1.3: SC-Marker (Fa. Stratagene) 7,5  $\mu$ l (Spur1); pASK85-D1.3 (80 ng/ $\mu$ l) unverdaut 2,5  $\mu$ l (2); pASK85-D1.3 (80 ng/ $\mu$ l) SV PstI 5  $\mu$ l (3); pASK85-D1.3 (80 ng/ $\mu$ l) DV PstI, BstEII 50  $\mu$ l (378 bp das herausgeschnittene Stück Vektor-DNA) (4,5);  $V_H$ -WGGD4-B4/PCR-Produkt-PCR24 DV PstI, BstEII 50  $\mu$ l (7); 1 kb Marker (Fa. NEB); 2,5  $\mu$ l (8); Ethidiumbromid-Anfärbung der DNA nach horizontaler Elektrophorese in TBE-Puffer.

Der hierfür entwickelte Vorwärtsprimer HC\_B4\_PstI ist genspezifisch für die  $V_H$ -Domäne des mAk WGGD4-B4 und kodiert zusätzlich für die Schnittstelle PstI. Für den Rückwärtsstrang wurde der Primer HC\_B4\_BstEII entwickelt, der ebenfalls trotz der eingefügten Mutationen genspezifisch bleibt und zusätzlich die Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease BstEII trägt. Die Amplifikation findet unter PCR-Standardbedingungen mit diesem Primerpaar und der Vektor-DNA: pCR2.1- $V_H$ -WGGD4-B4) statt. Die Abb. 3.48 zeigt beispielhaft für die  $V_H$ -Domäne die einzelnen Schritte, die zur Ligation in den Vektor pASK85-D1.3 geführt haben.

Die  $V_L$ -Domäne dieses mAk wurde gleichermaßen wie die  $V_H$ -Domäne hinter die  $V_H$ - und CH-Domäne ligiert. Hier wurden die entsprechenden Primer mit den auf den pASK-Vektoren ebenfalls singulären und standardisierten Restriktionsschnittstellen SacI und XhoI entwickelt: LC\_B4\_SacI-FW und LC\_B4\_XhoI.

Die fehlerfreie DNA-Sequenz des Vektors pASK85-B4 wurde durch zwei „Longrun“-Sequenzierungen von den entsprechenden Primern, die zur Herstellung der  $V_H$  und  $V_L$  in der PCR verwendet wurden, bestätigt (Fa. Sequiserve, Vaterstetten) (Abb. 3.49).

Die entsprechenden *E.coli* TOP10-Bakterienklone wurden als Dauerkulturen bei  $-80^\circ\text{C}$  konserviert. Es wurde genügend Vektor-DNA pASK85-B4 hergestellt, um den bakteriellen Expressionstamm *E. coli* JM83 zu transformieren. Von positiven JM83-Klonen wurden ebenfalls Dauerkulturen gesichert.

```

CAGGCCGAAGTTAAACCTGCAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCTGCAAGGCT
Q A E V K L Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A

TCTGGGTATACCTTCACAACTATGGAATG AACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGTTTAAAGTGGATGGCTGGATAAACACCTA
S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P G K G L K W M G W I N T Y

CACTGGAGAGCCAAACATATGCCGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTGTCAGATCAAC
T G E P T Y A D D F K G R F A F S L E T S A S T A Y L Q I N

AACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGAGAGAATTACTACGGTAGTAGCCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACT
N L K N E D T A T Y F C A R E N Y Y G S S P F A Y W G Q G T

CTGGTCACCCTCTCCTCAGCAAAGACCACTCCTCCGTCTGTTTACCCTCTGGCTCTGGTTCTGCGGCTCAGACTAACTCTATGGTGACT
L V T V S S A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T N S M V T

CTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCA
L G C L V K G Y F P E P V T V T W N S G S L S S G V H T F N

GCTGTCTGCAATCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACCTGCAACGTT
A V L Q S D L Y T L S S S V T V P S S T W P S E T V T C N V

GCCCAACCGGCTTCTAGCACCAAAGTTGACAAGAAAATCGTACCGCGCGACTGCCATCACCACCATCACCATTAATAACCATGGAGAAAA
A H P A S S T K V D K K I V P R D C H H H H H H .

TAAAGTGAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCCTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCGACATCAGAGCTCAACCCAGTCTCC
M K Q S T I A L A L L P L L F T P V T K A D I E L T Q S P

TCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCATTTCTATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAATATTTAGCCTGGTATCAAGCG
S Y L A A S P G E T I S I N C R A S K S I S K Y L A W Y Q A

AAACCTGGGAAACTAATAAGCTTCTTATCTACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGAATTCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGT
K P G K T N K L L I Y S G S T L Q S G I P S R F S G S G S G

ACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATAATGAATACCCGCTCACGTTT
T D F T L T I S S L E P E D F A M Y Y C Q Q H N E Y P L T F

GGTGTCTGGACCAAGCTCGAGCTGAAGCGCGCTGATGCTGCACCGACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA

```

Abbildung 3.49: Vektorkonstrukt pASK85-B4 mit den cDNA Sequenzen  $V_H$ - und  $V_L$ - des mAk's WGGD4-B4. Vektor-Backbonesequenz; rot: Restriktionsstellen ( $V_H$ : PstI, BstEII/  $V_L$ : SacI, XhoI); schwarz: eingefügte cDNA-Sequenz  $V_H$  and  $V_L$ ; grau: Signalsequenzen der  $V_H$  und  $V_L$ .

### **3.6.2.1 Heterologe Expression des rekombinanten Fab-Fragmentes B4 in *E. coli* JM83 und affinitätschromatographische Aufreinigung mittels IMAC**

Aufgrund seiner guten Sekretionseigenschaften in Verbindung mit einer effizienten Faltung rekombinanter Proteine empfahl sich für die gentechnische Herstellung des Fab-Fragmentes B4 der *E. coli*-Stamm JM83 (Fiedler, 2002). Nach dessen Transformation mit den Expressionsvektoren pASK85-B4 wurden Produktionskulturen im 2 l-Maßstab angesetzt. Bei einer Zelldichte von  $OD_{550} = 0,5$  wurde die Genexpression des Fab-Fragments durch Zugabe von 200 µg Anhydrotetracyclin in DMF pro l Kulturmedium für 3 h induziert. Nach 3 h Induktion befanden sich alle Kulturen im Übergang zur stationären Wachstumsphase, wobei noch keine Zell-Lyse zu beobachten war. Anschließend wurde jeweils die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die Isolierung des Fab-Fragmentes B4 aus der periplasmatischen Proteinfraction erfolgte mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie über das Hexahistidin-Affinitätsanhängsel des Fab-Fragmentes (Abb. 3.51).

Alle Eluatfraktionen wurden im SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.52). Die leichte und schwere Immunglobulinkette des Fab-Fragmentes waren im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 detektierbar. In Anwesenheit eines Reduktionsmittels (hier  $\beta$ -Mercaptoethanol, reduziert die interchenaren Disulfidbrücken, die die Ketten des Fab-Fragmentes zusammenhalten) waren die leichte und schwere Immunglobulinkette bei ca 24 und 26 kDa als Doppelbande (Abb. 3.51, Spur 6) zu erkennen. Die Fraktionen, die das Fab-Fragment enthielten, wurden zu 10 mM mit EDTA versetzt, gegen physiologisches PBS dialysiert und auf ein Endvolumen von 0,6 ml eingengt. Die Ausbeuten lagen in der Regel bei 0,4 mg/2 l Kultur.



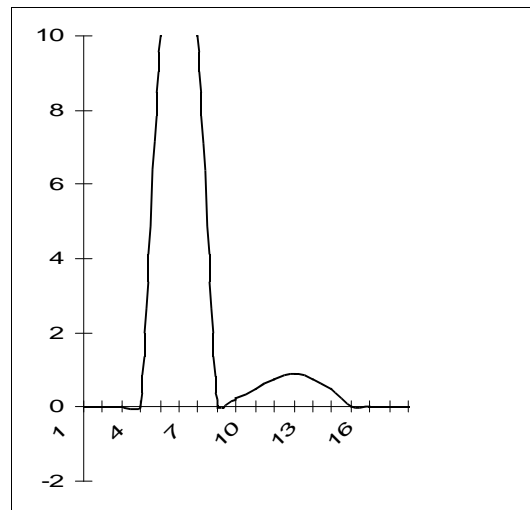


Abbildung 3.50: Elutionsprofil des mittels IMAC gereinigten rekombinanten Fab-Fragmentes B4: die Abs. bei 280nm ist in Abhängigkeit von den eluierten Fraktionen (zu je 2,5 ml) aufgetragen. In den Fraktionen des ersten Peaks werden unspezifisch an der Säule haftende Proteine eluiert (Fraktionen 5 -8) gefolgt von einem zweiten Peak der in der Regel homogenes Fab-Fragment B4 enthielt ( Fraktionen 9 -15)

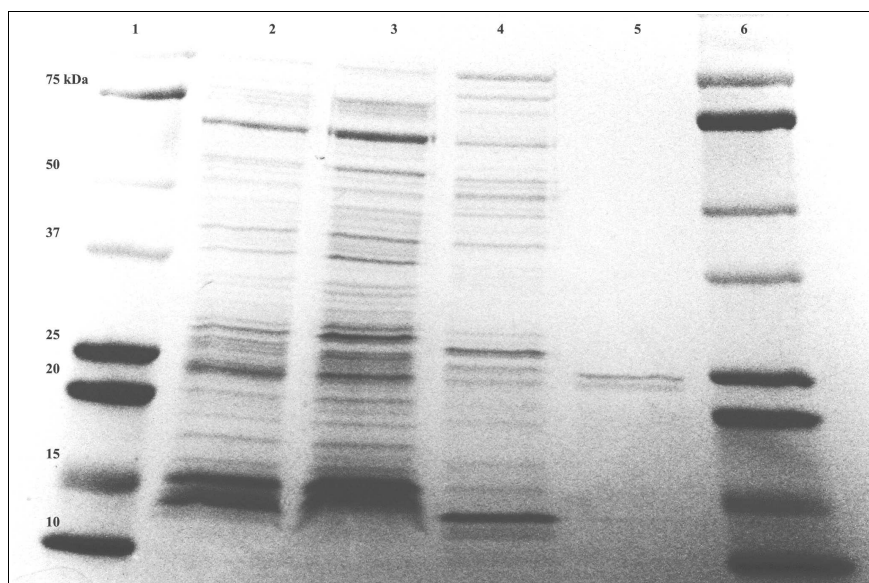


Abbildung 3.51: SDS-PAGE-Analyse und Coomassie-Blau-Färbung des mittels IMAC gereinigten rekombinanten Fab-Fragmentes B4 (hergestellt in *E.coli* JM83 vom Vektor pASK85-B4. Auf ein 4-20 %iges SDS-Polyacrylamid-Gradientengel wurde jeweils eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 2), des Durchlaufs (3) sowie zweier exemplarischer Eluatfraktionen im reduzierten Zustand (4, 5) aufgetragen; Kaleidoskope prestained standard, Bio Rad (1,6). Das Fab Fragment in Fraktionen wie in Spur 6 zu sehen (HC und LC apparentes MG ~25 kDa) wurden weiterverwendet.

### 3.6.3 Charakterisierung des *h*TNC-1 spezifischen Fab-Fragmentes Fab-B4 *in vitro*

#### 3.6.3.1 Bestimmung der Antigenerkennung des Fab-Fragmentes B4 gegen His-tagged-*h*TNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>)

Die Bindung des Antikörperfragmentes Fab-B4 an das rekombinante His-tagged-*h*TNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>) wurde mittels indirektem ELISA mit dem zuvor beschriebenen Aufbau (siehe Abschnitt 2.4.4) überprüft (Abb. 3.51). Es konnte eine konzentrationsabhängige Antigenbindungsaktivität mit einer apparenten Dissoziationskonstante von  $118 \text{ nM} \pm 23 \text{ nM}$  und einem  $\Delta A/\Delta T_{\text{max}} = 1,43$  nachgewiesen werden. Die Bindungssignale erwiesen sich als spezifisch, da in der Kontrolle mit BSA nur vernachlässigbare Signale auftraten.

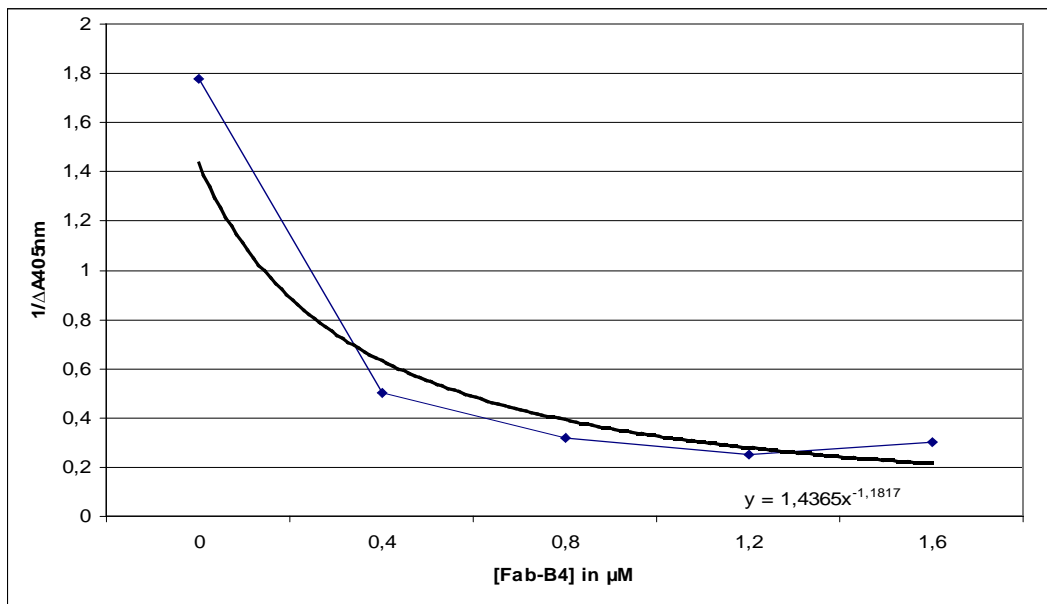


Abbildung 3.52: ELISA zur Untersuchung der *h*TNC-1-Antigenbindung des Fab-Fragmentes Fab-B4. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit gereinigtem His-tagged-*h*TNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>)-Antigen (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS/T) beschichtet und anschließend die Oberfläche mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des in *E. coli* JM83 mit pASK85-B4 produzierten und mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigten Fab-B4 appliziert. Als Kontrolle diente die Belegung der Vertiefungen mit BSA, wiederum gefolgt von der Inkubation mit einer Verdünnungsreihe des B4-Fab-Fragments. Gebundenes Fab-Fragment wurde anschließend mit Hilfe eines Anti-murinen C $\kappa$  IgG/AP-Konjugats durch Hydrolyse von *p*-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ( $\Delta A_{405}/\Delta t$ ) wurde in Abhängigkeit der jeweiligen Kehrwerte der Konzentration des Fab-Fragments aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mittels nicht-linearer potentieller Regression (Exel)

### 3.6.3.2 Charakterisierung des Fab-Fragmentes B4 mittels Western Blot

Für die Antigenerkennung im Western Blot wurden, wie unter 2.3.6 beschrieben, Gewebehomogenate von WHO°II und WHO°IV Gliomen und konditioniertes Medium der U87-MG Gliomzelllinie (sezernieren *hTNC-1* ins Medium) zu je 50 µg pro Spur auf ein 4-20%iges Polyacrylamid-Gradientengel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF Membran geblottet und wie unter 2.4.7 beschrieben die Immundetektion am Western Blot durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde das Fab-B4 0,17 µg/ml und parallel dazu der mAk WGGD4-B4 0,5 µg/ml getestet.

Wie in der Abb. 3.53 zu sehen ist, kann bei ca. 240 kDa der Nachweis des *hTNC-1* (unglykosylierte Form) mit beiden Antikörpermolekülen sowohl von WHO°IV als auch von U87-konditionierten Medien geführt werden. Bei ca. 260 kDa wurde die vollständig glykosylierte *hTNC-1* Form nachgewiesen (Maschler *et al.*, 2004). Mit WHO°II Gliomhomogenaten wurde nur eine ganz schwache Bande bei 260 kDa detektiert (niedergradige Gliome exprimieren weniger *hTNC-1* als WHO°IV Gliome).

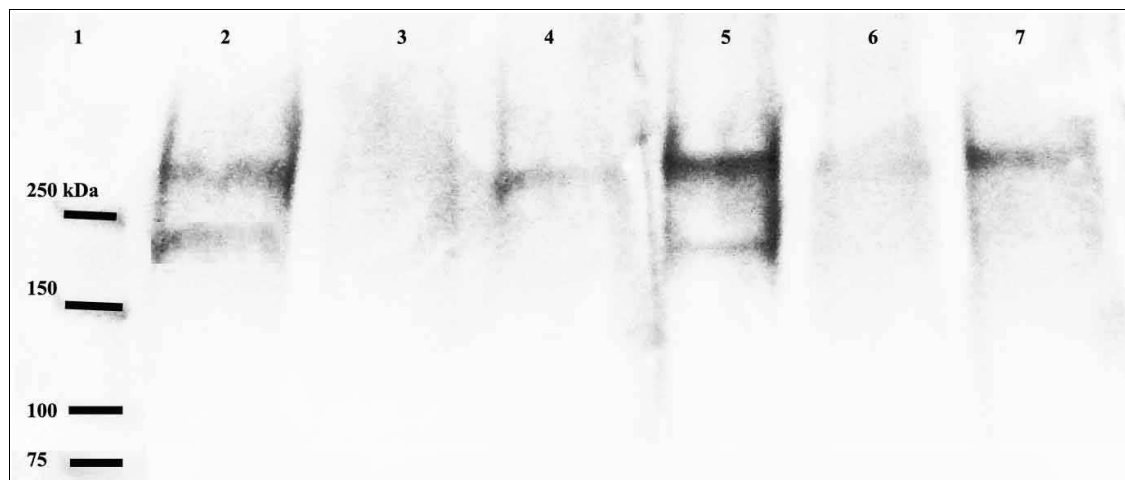


Abbildung 3.53: Western Blot nach SDS-PAGE: 4-20 %iges SDS-Polyacrylamid-Gradientengel: Standard (Spur 1); WHO°IV Gliomhomogenate (2, 5); WHO° II Gliomhomogenate (3, 6); U87-MG konditionierte und 50x ankonzentrierte Medien (lane 4,7). IMAC-gereinigtes rekombinant hergestelltes Fab-B4 (2 bis 4); Prot. A gereinigtes. mAk WGGD4-B4 (5 bis 6); Nachweis der unglykosylierten *hTNC-1* Isoform bei ca. 240 kDa und der glykosylierten bei ca. 260 kDa

### 3.6.4 Charakterisierung des *h*TNC-1 spezifischen Fab-Fragmentes Fab-B4 *in vivo*

#### 3.6.4.1 Kopplung des Radionuklides [<sup>111</sup>In]Indium an das Fab-B4

Die spezifischen Aktivitäten betrugen in der Regel 24 GBq [<sup>111</sup>In]Indium/mol Fab-Fragment B4. Nach Aufreinigung mittels PD 10 Säule betrug die radiochemische Reinheit ca. 92,5%. Die Qualitätskontrolle wurde mittels Dünnschichtchromatographie und Auslesen am Radiodetektor: MiniGITA, Fa. Raytest Analog zu 3.5.4 durchgeführt (Abb. 3.54).

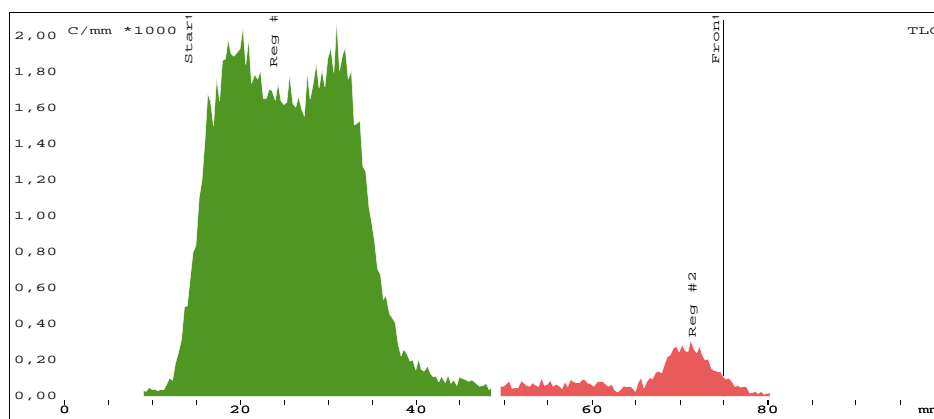


Abbildung 3.54: Qualitätskontrolle des Radionuklid [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA-konjugierten Fab-B4: Substanzfleck 1 (grün): [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA-konjugierten Fab-B4 ( $R_f = 0,17-0,4$ ), Substanzfleck 2 (rot): nicht Protein gebundenes [<sup>111</sup>In]Indium ( $R_f = 0,8-1,0$ ) (TLC-Methode und Auslesung mit Radioaktivitätsdetektor: Raytest MiniGITA, Fa. Raytest)

#### 3.6.5 Biodistribution und Biokinetik des [<sup>111</sup>In]Indium-konjugierten Fab-B4

Die Verteilung der Radionuklid konjugierten Fab-B4 wurde wie unter 2.6.2 beschrieben an jeweils 3 U87-xenotransplantierten SCID-Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Als Kontrolle wurde Tieren, die keinen Tumor trugen, die jeweils gleiche Tracermenge injiziert.

Die unspezifische Anreicherung war mit diesem Tracer entsprechend den Erwartungen gering (siehe 3.5.3).

Tabelle 3.9: Biodistributionsdaten des  $[^{111}\text{In}]$ Indium-DTPA konjugierten Fab-B4. Aktivitätsmengen als % ID/g (injizierte Dosis/Gramm Gewebe) bzw. die pro Tiergruppe ermittelten arithmetischen Mittel in den Organen: Tumor, Muskel, Blut/Herz, Nieren und Leber. (Gemessen im Gamma-counter)

Gewebe	1 h p.i.	6 h p.i.	12 h p.i.	24 h p.i.
Tumor	40,8%±1,45	0,5%±0,00	0,5%±0,01	0,2%±0,05
Muskelgewebe	0,07%±0,00	0,05%±0,00	0,05%±0,0	0,03%±0,00
Blut/Herz	0,32%±0,00	0,14%±0,00	0,13%±0,01	0,06%±0,00
Niere	8,17%±0,23	52,7%±2,21	16,32%±1,70	4,31%±0,2
Leber	1,05%±0,01	0,83%±0,00	1,5%±0,02	0,33%±0,01

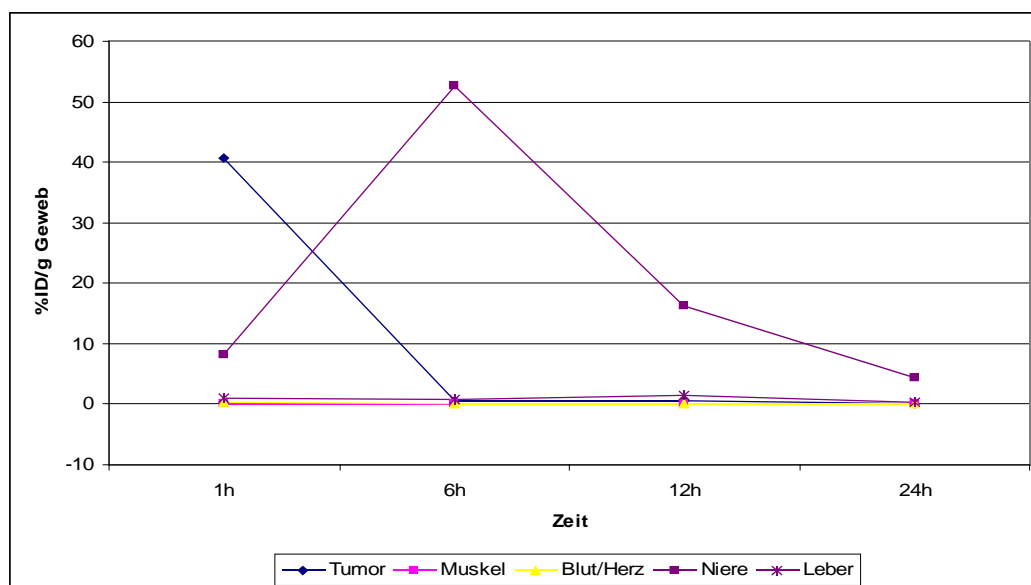


Abbildung 3.55: Zeitabhängige Verteilung des  $[^{111}\text{In}]$ Indium-DTPA-konjugierten Fab-B4 an den Organen: Tumor, Muskel, Blut, Niere, Leber

Der  $[^{111}\text{In}]$ Indium-DTPA konjugierte Fab-B4 zeigte eine maximale Anreicherung am Tumor von 40,8% der ID/g Tumor 1 h p.i. Im Vergleich zum mAk-WGGD4-B4, der erst nach 72 h seine maximale Anreicherung am Tumor mit 11% der ID/g Tumor erreichte, wies das Fab-Fragment aufgrund seiner geringen Größe (verglichen mit dem mAk) eine schnellere Assoziations-Kinetik zum Tumorantigen als der Antikörper auf (Maximum bereits nach 1 h p.i. erreicht). Die 4-fach höhere Anreicherung des Fab's am Tumor hängt wohl mit der besseren Penetration des soliden Tumors aufgrund der Größe des Fab's zusammen. Dem Fab-Fragment fehlt jedoch der Fc-Teil, was dazu führt, dass die Bindungsstärke (Avidität) des Fab's im Vergleich zum intakten mAk deutlich herabgesetzt ist, und das Fab aufgrund dessen schneller vom Tumor dissoziiert (nach 6 h waren nur noch 0,5 % der injizierten Dosis am Tumor wiederzufinden).

Die Ausscheidung dieses Tracers fand fast ausschließlich über die Nieren statt. Nach 6h fanden sich 52,7 % der injizierten Dosis an den Nieren wieder. Zu diesem Zeitpunkt war auch der größte Anteil an [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugiertem Fab-B4 ausgeschieden (nur noch 0,14% ID/g finden sich im Blut wieder. Über die Leber findet fast kein Abbau des Fab-Konjugates statt (max. 1,5%ID/g Leber). Die Biodistribution in den Referenzorganen Muskel, Magen und Darm blieben zu jedem gemessenen Zeitpunkt niedrig. Somit bindet das [ $^{111}\text{In}$ ]Indium-DTPA konjugierten Fab-B4 spezifisch am Tumor und zeigte keine unspezifische Anreicherung an den zuletzt genannten Organen. Muskel - als Nicht-Tumor Referenzorgan - weist durchwegs eine niedrige Dosis von maximal 0,07% der ID/g Muskelgewebe auf (Tab. 3.9; Abb. 3.55). Seine klinische Anwendung würde dieses Fab-Fragment auch in der Diagnostik finden, weil er sich durch seine schnelle Kinetik und spezifische Anreicherung am Tumor als möglicher guter Tarcner ausweist.

Die SPECT-CT Aufnahmen bestätigen die Biodistributionsdaten: nach 1 h war der Tumor am besten darstellbar. Nach 24 h konnte keine Aktivität mehr am Tumor in der U87-xenotransplantierten SCID Maus detektiert werden (Abb. 3.56). Aufgrund der niedrigen Aktivität, konnte nach 6h keine SPECT Aufnahme an der Symbia (Fa. Siemens) durchgeführt werden. Zu den Zeitpunkten 6h und 24 h p.i. wurden deshalb nur statisch-planare Aufnahmen an dem gleichen Tomographen durchgeführt.

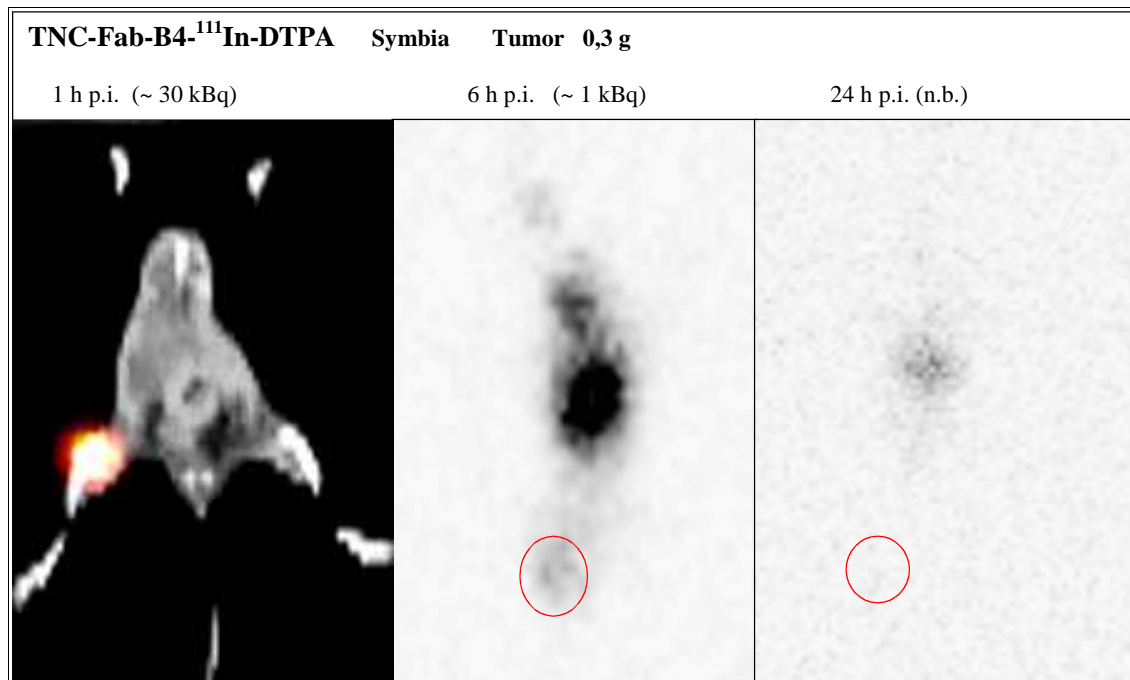


Abbildung 3.56: SPECT-CT und statisch-planare Aufnahmen an U87 xenotransplantierte SCID/weiblich 1 h, 6 h, 24 h, nach i.v. Injektion von 0,5 MBq [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA-konj.-Fab-B4: die Tiere wurden mit 1,2% Isofluran/1,6% O<sub>2</sub> anästhesiert. Für die Generierung der SPECT-CT Datensätze wurden die Tiere für 40 Minuten geimaged; der SPECT-Datensatz wurde mit dem CT-Bild fusioniert (1 h p.i.); Für die statisch-planaren Aufnahmen wurden die Tiere 30' lang gescannt. Dorsale Aufsicht/Kopf unten; Tumor ist rot eingekreist und befindet sich an der linken hinteren Flanke (SPECT: Matrix: 128er; ME Kolimator; Statisch-planare-Aufnahmen: Matrix: 256x256, Zoom 1, Zweikopfgamma-Kamera, Symbia, Siemens)





## 4 Diskussion

### Generierung *muriner* monoklonaler *hTNC-1* spezifischer Antikörper

In der vorliegenden Arbeit konnte ein neuer *muriner* monoklonaler Antikörper (kurz: mAk WGGD4-B4) hergestellt werden, der eine hohe Affinität ( $K_D \sim 35 \text{ nM} \pm 16 \text{ nM}$ ) gegenüber der FNIII-A3 Domäne der *hTNC-1* aufweist und keine Kreuzreaktivität mit den weiteren *hTNC* Isoformen oder anderen Proteinen zeigte. Des weiteren konnte mit den  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen des mAk WGGD4-B4 ein Fab-Fragment gentechnisch hergestellt werden. Das Fab-Fragment besitzt eine Affinität gegenüber dem Antigen von  $K_D \sim 118 \text{ nM} \pm 23 \text{ nM}$ . Für die RIT stehen nun ein mAk und ein Fab-Fragment zur Verfügung, die auch *in vivo* eine gute Pharmakokinetik zeigten.

Die Herstellung eines neuen Antikörpers und der Antikörperfragmente wurde mit dem Ziel durchgeführt, einen biologischen Träger für das Radionuklid zu erhalten, der durch seine Spezifität und hohe Avidität gegenüber dem tumorassoziierten Antigen (TAA) *hTNC-1* gekennzeichnet ist.

Der Antikörper wurde durch Immunisierung von Balb/c Mäusen generiert. Um ein optimales Antigen zur Verfügung stehen zu haben, wurden Sequenzanalysen aller bekannter *humaner* und *muriner* Tenascinen C Isoformen (*hTNC*, *mTNC*) durchgeführt. Ziel war es einen Bereich in der Proteinsequenz dieser Tenascine zu finden, der eine minimale Homologie der Isoform *hTNC-1* zu allen andern Isoformen aufweist. Im Zuge dessen konnte in diesem Zusammenhang ein Nachweis der *hTNC-1* Isoform auf gRNA und Protein Ebene (Western Blot) von WHO°III und °IV Gliomen geführt werden. Zusätzlich konnte auf RNA Ebene eine Korrelation der Expression dieser Isoform mit dem Malignitätsgrad dieser Gliome festgestellt werden. Die Domäne FNIII-A3 des *hTNC-1* erwies sich als der Bereich, der allen *murinen* Isoformen und den *hTNC-2*, -3, -5, und -6 fehlt, da es in diesen Isoformen durch alternative Spleißprozesse entfernt wurde. Die Isoform *hTNC-4* kodiert zwar ebenfalls für die FNIII-A3 Domäne, es konnte jedoch kein Nachweis dieser Isoform und der *hTNC-1* Isoform von gRNA gesunder Hirnbiopsaten geführt werden. Auch in der Literatur wurde nicht die Expression und damit zusammenhängend die Funktion dieser Isoform 4 näher beschrieben. Aufgrund des fehlenden Nachweises an gesunden Hirnbiopsaten und in Maus wurde entschieden, die Antigenizität der FNIII-A3 Domäne als mögliches Antigen zu untersuchen. Rechnerbasierte Sequenzanalysen der Aminosäuresequenz der FNIII-A3 Domäne mit verschiedenen Algorithmen konnten mit hoher Wahrscheinlichkeit für bestimmte Aminosäurefolgen (Epitope) ihre Positionierung im gefalteten Polypeptid voraussagen. Diese Bereiche stellen für das Immunsystem von Vertebraten besser exponierte Abschnitte im Antigen, mit zahlreichen geeigneten Epitopen dar. Epitope, die MHC-Motive für das Immunsystem von Vertebraten darstellen könnten, rechnete der Sette-

Algorithmus (Sette, *et al.*, 1989). Die Epitope R94-T100 und E106-T112 des FNIII-A3-Antigens werden mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Oberfläche im gefalteten Polypeptid positioniert und wurden vom Sette-Algorithmus zusätzlich als mögliche MHC-Motive bestätigt. Einen guten Antigenizitätsindex für die Domäne FNIII-A3 zeigte auch der relativ hohe Anteil der Aminosäuren Prolin und Tryptophan (insgesamt 10%) auf. Diese beiden Aminosäuren werden als sogenannte Helixbrecher bezeichnet, weil sie die Ausbildung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Blättern verhindern bzw. in der Aminosäuresequenz in Bereichen ( $\beta$ -Turns) zwischen  $\alpha$ -Helices und/oder  $\beta$ -Blättern zu stehen kommen.  $\beta$ -Turns haben einen hohen Antigenizitätsindex. Glycin wiederum (8,12%) ist die kleinste Aminosäure und ermöglicht eine hohe sterische Flexibilität im Protein und somit die Ausbildung von aliphatischen  $\alpha$ -Helices, die ebenfalls positiv zum Flexibilizitäts- und somit zum Antigenizitätsindex dieses Antigens beitragen (Eisenberg, *et al.*, 1982). Die Aminosäure Cystein kommt in der FNIII-Domäne A3 gar nicht vor. Cystein ist an der Bildung von  $\beta$ -Blättern beteiligt. Da  $\beta$ -Blätter keine geeigneten Epitope bieten, sollte im Antigen kein Cystein vorhanden sein.

Ein zusätzlicher Vorteil der FNIII-A3 Domäne ist ihre C-terminale Lage im *hTNC-1*-Molekül. Die Untereinheiten im *hTNC-1*-Hexamer sind N-terminal miteinander verbunden, so dass ein geeignetes Epitop weit C-terminal liegen sollte, damit der Antikörper einen guten Zugang zum entsprechenden Epitop haben kann.

FNIII-A3 ist aufgrund der zahlreichen Epitope mit hohem Antigenizitätsindex und der C-terminalen Lage im *hTNC-1* Molekül als Antigen geeignet und wurde als His-tagged Polypeptid: His-tagged-*hTNC-1*(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>) in *E. coli* gentechnisch hergestellt.

Die gerichtete Klonierung des für dieses Polypeptid kodierenden cDNA Abschnittes wurde in den Expressionsvektor pET151/D-TOPO (Fa. Invitrogen) durchgeführt. Die Richtigkeit des Leserasters des vor den 6xHis-Tag klonierten DNA-Abschnittes wurde mittels PCR mit genspezifischen und vektorspezifischen Primern und mittels DNA-Sequenzierung (Fa. Sequiserve, Vaterstetten) bestätigt. Wichtig ist hier, dass die cDNA für das Polypeptid in der richtigen Orientierung in den Vektor ligiert wurde (N-terminal an das 6xHis-Tag) und dass der cDNA-Leserahmen keine Mutationen enthält, da sonst keine korrekte Polypeptidkette in *E. coli* generiert werden kann.

Die Expression in *E. coli* BL21 wurde vorab in einem Pilotexperiment überprüft. Die optimale Dauer der Expression des Polypeptides in BL21 nach Induktion einer log-Phase-Kultur mit IPTG sollte derart ermittelt werden. Abhängig von den physikalischen Eigenschaften (Ladung, Lipophilie, Toxizität...) des zu exprimierenden Peptides kommt es während der Expression zur Einlagerung des Peptides in sogenannte „Inclusion Bodies“, ähnlich den Einschlusskörper/Nahrungsvakuolen, die typischerweise in *E. coli* gebildet werden, wenn ein Überangebot an Fetten bzw. Zuckern vorherrscht. Die hier eingeschlossenen Polypeptide könnten, abhängig von den physikalischen Beschaffenheiten des Polypeptides, zum größten Teil richtig gefaltet vorliegen.

Lediglich die Aufreinigung aus diesen Einschlusskörperchen setzt stark denaturierende Bedingungen voraus, die eine starke Entfaltung des Peptides zur Folge hätten. Da das Tenascin C ein extrazelluläres Matrix-Protein ist, kann es ebenso dazu kommen, dass das hier zu exprimierende Polypeptid aus der Bakterien-Zelle exozytiert wird. Um dies ausschließen zu können, wurde in diesem ersten Pilotexperiment der Kulturüberstand der *E. coli* Kultur ebenfalls analysiert.

Nach der Induktion der Expression wurden kleine Aliquots der Kultur entnommen, um in Abständen von jeweils einer Stunde und bis zu vier Stunden nach erfolgter Induktion jeweils die Expression zu überprüfen.

Die Zellen wurden pelletiert und der Verbleib des Peptides bestimmt. Das Zellpellet wurde getrennt vom Überstand im Anschluss mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Es zeigte sich, dass der Großteil des His-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>) 3 h nach erfolgter Induktion als lösliches Polypeptid im Zytoplasma zu finden ist. Nach dieser Zeit konnte immer weniger gelöstes Polypeptid nachgewiesen werden, da vermehrt unlösliche „inclusion bodys“ gebildet werden. Das His-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1428</sub>) konnte auch nicht im Kulturmedium detektiert werden.

Die relativ hohe Ausbeute von ca. 4 bis 6,5 mg His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) und die im SDS-PAGE bestätigte zu mindestens 90% homogene His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>)-Lösung zeigte, dass die Expression das gewünschte Polypeptid einer Größe von ca. 22 kDa in einer für die folgende Immunisierung und *in vitro* Austestung der Antikörper ausreichenden Reinheit lieferte.

Die Immunisierung von Balb/c Mäusen mit dem His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) konnte erfolgreich durchgeführt werden. Alle 5 Tiere zeigten nach der 4ten Immunisierung (3ter Boost) einen Titer, der bei über 1: 328 050 lag. Man spricht ab einem erreichten Titer von 1 : 50 000 bereits von einer erfolgreichen Immunisierung. Der hier erreichte Wert zeigte auf, dass das Antigen His<sub>6</sub>-tagged-*hTNC*-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) die im Vorfeld durchgeführten Analysen zur Bestimmung der Antigenizität mehr als bestätigt hat, und dass die richtige Strategie für die Immunisierung gewählt wurde.

In Anlehnung an das von Kennett (Kennett, 1979) entwickelte Fusionsprotokoll wurde zur Herstellung einer hohen Rate immortalisierter Hybridomas die B-Zellen der immunisierten Mäuse mit den Zellen der Linie P3X63Ag8.653 fusioniert. Mit einem sekundären fluoreszenzmarkiertem Antikörper konnte die an der Oberfläche dieser Zellen präsentierten Antikörper vom Typ IgG nachgewiesen werden. Dieser Nachweis wurde zur Bestimmung des sogenannten „producer“-Anteils einer Zell-Linie (Abb. 3.12 rechts) durchgeführt. Zelllinien, welche einen geringeren Anteil als 90% an Antikörper produzierende Zellen aufwiesen, wurden nicht weiter kultiviert. Sogenannte „Non-producer“ haben gegenüber den „Producern“ eine erhöhte Wachstumsrate, wodurch sie die Antikörperproduzierenden Zellen innerhalb einer Linie zahlenmäßig innerhalb weniger Generationen überholen würden. Anschließend an die HAT-Selektion wurden

die so erhaltenen Hybridoma im HT-Erholungsmedium mittels indirektem ELISA auf ihre Affinität gegenüber dem zur Immunisierung verwendeten Antigen getestet. Es wurden nur Kulturen der Vereinzellung zugeführt, deren Antikörper produzierender Zellanteil höher als 90% war und die gleichzeitig im ELISA ein mindestens vierfach höheres Signal im Vergleich zu den Kontrollen zeigten. Die Vereinzellung wurde mittels „limiting-dilution“-Klonierung (2.5.10) durchgeführt. Diese Art der Klonierung bietet eine höhere Sicherheit (verglichen mit anderen Methoden der Vereinzellung) auch tatsächlich Zelllinien zu generieren, die monoklonal sind und aus einer einzigen Zelle hervorgegangen sind.

Die zweite Affinitätsprüfung, die ebenfalls mittels indirektem ELISA durchgeführt wurde, lieferte sechs Hybridomaklone: WGG001, WGG008, WGG6A6/4, WGG6C5/8, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4, die alle ein ausreichend positives Signal zeigten und die weiter histologisch und im Western Blot charakterisiert wurden, nachdem die Adaptation an serumfreie Kulturbedingungen und Bioreaktor abgeschlossen waren.

Die Adaptation an die Kulturbedingungen serumfreier, chemisch definierter Medien hat den Vorteil, dass keine Fremd-Antikörper (in diesem Fall Rinder IgG's) in die konditionierten Medien eingebracht werden und auch nach der Protein A Reinigung die eigentlich zu gewinnende Antikörperfraktion kontaminieren würden. Die Adaptation der Hybridomazelllinien an die Wachstumsverhältnisse im Bioreaktor bietet den Vorteil über den Labormaßstab hinaus größere Antikörpermengen produzieren zu können. Durch die Trennung des Produktionsmoduls vom Versorgungsmodul können den Zellen im Produktionsmodul Nährstoffe die kleiner 12,5 kDa sind (Glucose, Mineralstoffe, kleine Wachstumshormone...) weiterhin zugeführt werden, ohne dass die konditionierten Medien mit größeren Fremd-Proteinen kontaminiert werden.

Die derart produzierten Antikörper wurden isotypisiert. Alle sechs Klone produzieren Antikörper vom Typ IgG<sub>3</sub>, so dass eine Aufreinigung über das dem IgG<sub>3</sub> affinere Protein A als sinnvoll erschien. Die Ausbeuten von 2 bis 10 mg Antikörper aus insgesamt 500 ml konditioniertem Medium waren klonabhängig.

Die Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde mittels Western Blot durchgeführt und zeigte, dass alle sechs monoklonalen Antikörper nur ein Protein bei ca. 240 kDa erkennen. Hierbei handelt es sich um das *hTNC-1*. Histologisch konnte sowohl an Cryo- als auch an HOPE-fixierten Schnitten nur an WHO°IV Gliomen der Nachweis von *hTNC-1* im ECM geführt werden. Die Schnitte von gesunden Hirngewebe zeigten bis auf den Klon WGG6A6/4 keine Signale mit den Antikörpern. Dieser Klon wurde deshalb auch nicht weiter *in vivo* untersucht. Die fünf Klone WGG001, WGG008, WGG6C5/8, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4 zeigten keine Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen aus WHO°IV Gewebekomogenaten oder Histoschnitten und reagierten nicht mit Strukturen an gesunden Hirngewebe kreuz.

Da der Hybridomaklon WGGD4-B4 die höchste Antikörperproduktionsrate zeigte und sich am schnellsten an veränderte Kulturbedingungen anpasste und eine stabil hohe Wachstumsrate zeigte, wurden für diesen Antikörper die Bindeeigenschaften an das His<sub>6</sub>-tagged-*h*TNC-1(P<sub>1257</sub>-V<sub>1420</sub>) durch Bestimmung der Dissoziationskonstante annähernd mittels indirektem ELISA ermittelt. Es konnte eine konzentrationsabhängige Antigenbindungsaktivität mit einer apparenten Dissoziationskonstante von  $35 \text{ nM} \pm 16 \text{ nM}$  und einem  $\Delta A/\Delta T_{\text{max}} = 0,45$  ermittelt werden. Da die Trendlinie den tatsächlichen Kurvenverlauf lediglich annähert, ist dieser Wert nur ein Näherungswert für die tatsächliche Dissoziationskonstante dieses Antikörpers. Da jedoch die Steigung der Trendlinie mit der der Kurve der gemessenen Werte sehr gut übereinstimmt ( $\Delta A/\Delta T_{\text{max}} \sim 0,45$ ) ist die hier bestimmte Dissoziationskonstante ein verlässlicher Wert für diesen Antikörper. Ein affiner mAk zeichnet sich durch einen  $K_D$ -Wert aus, der mindestens im mikromolaren Bereich liegen. Der  $K_D$ -Wert für den Antikörper WGGD4-B4 liegt weit darunter im nanomolaren Bereich. Denn je höher die Affinität eines Antikörpers zu seinem Antigen ist, desto niedriger ist die  $K_D$ -Konstante.

Vier der fünf mAk wurden weiter unter physiologischen Bedingungen in mit U87-MG xenotransplantierten SCID-Mäusen getestet. Der Klon WGG6C5/8 wurde aufgrund seiner geringen Antikörperproduktionsrate nicht evaluiert, da für die *in vivo* Austestung weit größere (einige mg) Antikörpermengen hergestellt hätten werden müssen.

Die mAk WGG001, WGG008, WGG1/1-D3 und WGGD4-B4 wurden mit [<sup>123</sup>I]Iod konjugiert. Der mAk WGGD4-B4 wurde zusätzlich mit [<sup>111</sup>In]Indium konjugiert, da in der klinischen Anwendung ebenfalls metallische Nuklide zum Einsatz kommen. Ein Problem bei iodierten Antikörpern, die in SCID-Mäusen ausgetestet wurden, ist die rasche enzymatische (Zhu *et al.*, 1994) Dehalogenierung der Antikörper *in vivo* und die dadurch bedingte hohe unspezifische Akkumulation des freien [<sup>123</sup>I]Iod in den Referenzorganen. Freies [<sup>123</sup>I]Iod wurde ebenfalls mit hoher Affinität in der Schilddrüse, angereichert. Trotz der Gabe des Schilddrüsen-Blockers Natriumperchlorat (Handelsname: Irenat) war die unspezifische Anreicherung des freien [<sup>123</sup>I]Iods auch an den Organen des Magen-Darm-Traktes erhöht (Vorkommen des Na/I-Symporters: Wapnir *et al.*, 2003). Der Großteil des Tracers war nur kurz (wenige Stunden) im Blutkreislauf vorhanden und reicherte sich anschließend im Tumor bzw. unspezifisch in den Ausscheidungsorganen und der Schilddrüse an.

Das Biodistributionsverhalten der mAk wurde im Gammacounter durch Bestimmung der Aktivitätsmengen als %ID/g (injizierte Dosis/Gramm Gewebe) in verschiedenen Organen erhoben. Die hier getesteten monoklonalen Protein A gereinigten Antikörper zeigten eine Konzentrationssteigerung am Tumor bis zu 24 h (mit Antikörper abhängigen Anreicherungen von bis zu durchschnittlichen 21% der ID/g Tumor) mit einer anschließenden langsamen Dissoziation vom Zielantigen und somit vom Tumor. Es konnten mit allen Antikörpern noch nach 72 h Tracermengen von bis zu 16% der

ID/g Tumor detektiert werden (Abb. 3.26). Wobei Muskel als Nichttumor Referenzgewebe einen niedrigen Hintergrund von maximal 5,8% der ID/g Muskelgewebe zeigte (Abb. 3.27). Das Hirn der Mäuse wurde nicht untersucht, da ein AK nicht Blut-Hirn-Schranke gängig ist, und aufgrund dessen keine Anreicherung zu erwarten war. In der Literatur beschriebene *in vivo* Tierstudien an ähnlichen Tiermodellen bestimmen in vielen Fällen das Hirn nicht mit oder es werden maximal 0,25 % ID/g Hirn nach 24 h bestimmt (Boskovitz *et al.*, 2003). Anders sieht die Verteilung des mAk an den anderen Organen aus. Hier sind die unerwünschten spezifischen Anreicherungen des durch Dehalogenierung frei werdenden [<sup>123</sup>I]Iodes an der Schilddrüse und im Magen-Darm-Trakt oder auch durch den Abbau des Radionuklid markierten Antikörpers an der Leber und dessen Ausscheidung über die Nieren mit Werten von bis zu 34% der ID/g Gewebe sehr hoch. Eine graphische Auswertung wurde für diese Organe mit dem [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA-markierten WGGD4-B4 durchgeführt, da diese Werte deutlich niedriger ausfielen und als unspezifische Anreicherung zu deuten waren (Motta-Hennessy *et al.*, 1990). Der Antikörper WGGD4-B4 zeigte eine Konzentrationssteigerung am Tumor bis zu 72 h p.i. mit einer mittleren Anreicherungen von 11,08% der ID/g Tumor (Tab. 3.6; Abb. 3.31). Für eine anschließend langsame Dissoziation vom Zielantigen und somit vom Tumor, sprechen die hier gemessenen Werte bis zu 120 h p.i. Zu diesem letzten gemessenen Zeitpunkt waren immer noch ca. 9% der injizierten Dosis am Tumor wiederzufinden. Die Biodistribution in den Referenzgeweben Muskel, Magen und Darm blieben zu jedem gemessenen Zeitpunkt niedrig. Der mAk bindet demnach spezifisch am Tumor und zeigt keine unspezifische Anreicherung an den zuletzt genannten Organen. Muskel, das Nichttumor-Referenzgewebe, wies durchwegs eine niedrige Dosis von maximal 1,65% der ID/g Muskelgewebe auf (Tab. 3.6; Abb. 3.31). Die steigenden Verhältnisse von Tumor zu Referenzgewebe an all diesen Organen zeigen auf, dass der unspezifische kleine Anteil der Radioaktivität an diesen Organen nicht auf einer Antigenbindung zurückzuführen ist (Abb. 3.32). Die lange Verweildauer bzw. die langsame Dissoziation vom Tumor zeichnen die hohe Avidität dieses mAk aus. Dieser mAk bindet über mehrere Tage hinweg stabil an seinen TAA, das vorher *in vitro* evaluierte hTNC-1. Die Szintigramme mit [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA konjugiertem mAk WGGD4-B4 bestätigen bildlich die in der Biodistribution erhobenen Daten. Mit zunehmender Ausscheidung des [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA konjugierten mAk WGGD4-B4 nimmt die unspezifische Dosis an den Referenzgeweben ebenfalls ab, der Tumor bleibt jedoch auch noch 120 h p.i. detektierbar (Abb. 3.33).

Die Bindeeigenschaften des zur Zeit in klinischen Studien eingesetzte BC-24 wurde gleichermaßen bestimmt wie zuvor die in dieser Arbeit neu generierten mAk.

Die Analysen zur Kreuzreaktivität dieses mAk zeigten, dass der BC-24 mit einigen Proteinen kleiner 190 kDa kreuzreagiert. Ebenso haben Dot Blot Analysen mit gesunden

Gehirnhomogenaten gezeigt, dass dieser mAk auch Epitope an diesen Geweben erkennt und hier bindet. Die Histo-Daten bestätigten die Western Blot Daten dahingehend, dass auch hier an HOPE-eingebetteten Schnitten von gesunden Hirnbiopsaten mit dem BC-24 der Nachweis einer Kreuzreaktivität geführt werden konnte. An WHO°IV Schnitten zeigte sich eine inhomogene Anfärbung der Schnitte bzw. die hauptsächliche Anfärbung von endothelialen Strukturen.

Die physiologischen Bindeeigenschaften dieses Antikörpers wurden ebenfalls im gleichen Maus Modell untersucht, wie für die neuen Antikörper. Hierfür wurde der BC-24 mit [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA markiert. Die Biodistribution des BC-24 unterscheidet sich dahingehend von der des WGGD4-B4, dass der BC-24 zwar eine schneller Anreicherung am Tumor zeigte, die Maximale Anreicherung lag jedoch mit ca. 2% unter den für den WGGD4-B4 bestimmten Werten. BC-24 zeigte auch eine schnellere Dissoziation vom Zielantigen und somit vom Tumor als der mAk WGGD4-B4: 72 h p.i. waren mit WGGD4-B4 noch ca 11% ID/g Tumor detektierbar, wohingegen mit dem mAk BC-24 nur noch ca. 8% ID/g Tumor nachweisbar sind. Die Biodistribution in den Referenzgeweben Muskel, Magen und Darm blieben zu jedem gemessenen Zeitpunkt niedrig. Die Werte waren jedoch gegenüber dem WGGD4-B4 um ca. 1 - 2% erhöht. Die Anreicherung des radioaktiv konjugierten mAk sank in der Leber stetig ab (72 h p.i.: ca. 4% ID/g Leber). Zu Beginn der Biodistributionsstudie zum Zeitpunkt 2 h wurden bereits 12 % der ID/g Leber detektiert, was einen raschen Abbau des Immunkonjugats an der Leber bedeutet und mit einer geringeren *in vivo* Plasmastabilität korreliert (verglichen mit dem WGGD4-B4). Die Ausscheidung des dissoziierenden bzw. nicht gebundenen in der Leber verstoffwechselten mAk über die Nieren ist Anfangs mit Werten um die 12% ID/g Niere relativ hoch, sinkt jedoch ebenfalls, sobald die Aktivität aus dem Blutpool verschwindet. Die Szintigramme mit [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA konjugiertem mAk BC-24 bestätigen bildlich die in der Biodistribution erhobenen Daten. Mit zunehmender Ausscheidung des [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA konjugierten mAk BC-24 nimmt die unspezifische Dosis am Tumor und an den Referenzgeweben ab, der Tumor blieb bis zu 72 h p.i. detektierbar (Abb. 3.37).

Der in dieser Arbeit generierte mAk WGGD4-B4 zeigte insgesamt eine höhere physiologische Avidität gegenüber dem TAA *hTNC-1* als der BC-24. Auch die pharmakokinetischen Eigenschaften des WGGD4-B4 waren besser, verglichen mit denen des BC-24. Hinzu kommt, dass BC-24 mit Strukturen an gesunden Hirngewebe kreuzreagierte. Der WGGD4-B4 zeigte hingegen keinerlei Kreuzreaktivität. Durch diesen neuen mAk könnte eine Verminderung der Nebenwirkungen der RIT erreicht werden und zudem würde man mit diesem mAk eine höhere Dosis am Tumor erreichen, was die Effizienz der Therapie steigern könnte.

### **Heterologe Produktion des rekombinanten Fab-Fragmentes B4 in *E. coli***

Für die Produktion rekombinanter Proteine ist *E. coli* der am häufigsten in der modernen Biotechnologie benutzten Wirtsorganismus. Seine Fähigkeit zu raschem Wachstum und hohen Zelldichten in preiswerten Substratmedien, seine gut charakterisierte Genetik (Koonin, 1997) und die Verfügbarkeit einer steigenden Anzahl von Klonierungsvektoren ermöglichen die gentechnische Herstellung zahlreicher Proteine in hoher Quantität und Qualität (Baneyx, 1999; Swartz, 2001). Etablierte wirtseigene Signalsequenzen sekretorischer Proteine (z. B. OmpA, OmpT, PelB, Bla und PhoA) ermöglichen den effizienten heterologen Transport von Polypeptiden über die innere Bakterienmembran (Baneyx, 1999), eine Sekretionsstrategie die in dieser Arbeit zur gentechnischen Herstellung von Antikörperfragmenten in *E. coli* verwendet wurde (Skerra & Plückthun, 1988).

Zur Konstruktion des *h*TNC-1-spezifischen Fab-Fragments wurden die variablen Regionen der  $V_H$  und  $V_L$  des mAk WGGD4-B4 an die *murinen*, konstanten Regionen von Maus-IgG in den Expressionsvektor pASK85-D1.3 (freundlicherweise von Prof. Skerra zur Verfügung gestellt) kloniert und gentechnisch hergestellt (Skerra, 1994). Die variablen Regionen wurden in separaten PCR-Reaktionen von revers transkribierter gRNA hergestellt und in den pASK85-D1.3 inseriert. Die Versuche die cDNA-Regionen der  $V_H$  und  $V_L$  mit degenerierten Primern und unter Standard-PCR-Bedingungen zu erhalten, lieferten nur Immunglobulin-Pseudogene. Die anschließend eingesetzten genspezifischen Gegenstrangprimer lieferten die variablen Immunglobulingene mittels 5'-RACE-PCR. Mit den folgenden Nested PCR's konnten genügend Amplifikate erzeugt werden, um die Klonierung dieser cDNA-Abschnitte in den Vektor pCR2.1 (Fa. Invitrogen) durchführen zu können. Es wurden u.a. von den mAk WGG008 und WGGD4-B4 die  $V_H$ - und  $V_L$ -Regionen amplifiziert. Über die PCR-Reaktion des  $V_L$ -Gens wurden die zur Klonierung nötige Restriktionsstellen XhoI und PstI an  $V_L$ - und BstEII bzw. SstI an die  $V_H$ -cDNA angefügt. Dadurch wurde erst die Klonierung in den Expressionvektor pASK85-D1.3 ermöglicht und erfolgreich für die  $V_H$  und  $V_L$  cDNA's des mAk WGGD4-B4 durchgeführt. Sequenzanalysen der durch die anschließende Sequenzierung erhaltenen cDNA Sequenzinformationen zeigten, dass die hypervariablen Domänen dieses mAk stark mutiert waren, also ein wiederholter Kontakt mit dem Antigen während der Immunisierung stattgefunden haben muß. Die hochkonservierten Positionen der CDR-, FWR-Regionen und der beiden Cystein-Reste wurden durch weitere Sequenzanalysen bestätigt. Es zeigte sich, dass Sequenzhomologien zu Immunglobulin Keimbahngenen vorhanden sind, und dass es sich bei den hier klonierten Sequenzen tatsächlich um variable Immunglobulin-Regionen handelt. Die heterologe Produktion von Antigen bindenden Immunglobulin Fragmenten wurde mit der von Skerra & Plückthun (1988) sowie unabhängig davon von



Better et al. (1988) entwickelten Sekretionsstrategie realisiert. Ein etabliertes Verfahren zur heterologen Herstellung von Antikörperfragmenten ist die Verwendung des dicht reprimierten Tetracyclin-Promotor/Operator-Systems. Funktionale Immunglobulin-Fragmente können so weit über den Labormaßstab produziert werden (Schiweck & Skerra, 1995). Zur Minimierung der Aggregation sekretorischer Proteine im Periplasma von *E. coli* wurde das Nährmedium mit 0,3 M des nicht metabolisierbaren Disaccharids Saccharose supplementiert (Bowden & Georgiou, 1988). Die Wahl des Bakterienstamms für die Produktion heterologer Proteine in Schüttelkulturen wurde in der Literatur als wichtiger Faktor hinsichtlich der Ausbeute diskutiert (Zabriniskie & Acuri, 1986; Sambrook *et al.*, 1989). Hier wurde das Fab-Fragment im *E. coli* Bakterienstamm JM83 zur Überexpression gebracht. Aufgrund der zufriedenstellenden Ausbeuten von 0,4 mg/2l Schüttelkultur geht kein toxischer Effekt auf die Zellstabilität von *E. coli* vom zu exprimierenden Fab-Fragment aus. Mit der Verwendung von Ampicillin als Selektionsmarker trat wohl auch kein Plasmidverlust auf und eine hohe Plasmidstabilität mit 90-95 % zum Zeitpunkt der Ernte konnte ebenfalls realisiert werden. Die affinitätschromatographische Aufreinigung der Fab-Fragmente aus der periplasmatischen Zellfraktion war aufgrund der Peptidkodierenden Sequenz des His<sub>6</sub>-Tags im Expressionsvektor pASK85-D1.3 möglich. In dieser Arbeit konnte im Labormaßstab mittels Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) bis zu 0,4 mg Fab-Fragment über das His-Tag gereinigt werden, das für die weiteren Anwendungen verwendet werden konnte, nachdem im SDS-PAGE die Reinheit der Fab-Lösungen festgestellt wurde. Die Leicht- und Schwere-Ketten der eluierten Fab-Fragmente erschienen unter reduzierenden Bedingungen als zwei verschiedene Proteinbanden in äquimolaren Mengen einer Größe von ca. 25 kDa, wie bei Plückthun und Skerra (1989). Die Applikation der eluierten Fraktionen im ELISA bestätigte die erfolgreiche Reinigung der Fab-Fragmente aus dem Periplasmaextrakt und zusätzlich deren Funktionalität.

Die Affinitätsberechnungen in den indirekten ELISA-Messungen ergaben eine konzentrationsabhängige Antigenbindungsaktivität mit einer apparenten Dissoziationskonstante von  $118 \text{ nM} \pm 23 \text{ nM}$ . Allerdings ist der hier mittels nichtlinearer Regression angenährte Wert nicht exakt. Die Steigung der Trendlinie ist größer als die der Kurve der tatsächlich gemessenen Werte, so dass der  $K_D$ -Wert tatsächlich etwas niedriger ist. Die Bindungssignale erwiesen sich als spezifisch, da in der Kontrolle mit BSA nur vernachlässigbare Signale auftraten.

Für die Bestimmung der Kreuzreaktivität im Western Blot wurden Gewebekomogenate von WHO°II und WHO°IV Gliomen und konditioniertes Medium der U87-MG Gliomzelllinie (sezernieren *hTNC-1* ins Medium) analysiert. Wie in der Abb. 3.52 zu sehen ist, kann bei ca. 240 kDa der Nachweis des *hTNC-1* (unglykosylierte Form) sowohl mit dem Fab-Fragment B4 als auch in der parallel dazu durchgeführte Kontrolle

mit dem WGGD4-B4 sowohl von WHO°IV als auch von U87-konditionierten Medien geführt werden. Bei ca. 260 kDa wurde die vollständig glykosylierte *hTNC-1* Form nachgewiesen (Maschler *et al.*, 2004). Mit WHO°II Gliomhomogenaten wurde nur eine ganz schwache Bande bei 260 kDa detektiert (niedergradige Gliome exprimieren weniger *hTNC-1* als WHO°IV Gliome siehe 3.1.1).

Der [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA konjugierte Fab-B4 zeigte eine maximale Anreicherung am Tumor von 40,8% ID/g Tumor 1 h p.i. Im Vergleich zum mAk-WGGD4-B4, der erst nach 72 h seine maximale Anreicherung am Tumor mit 11 % der ID/g Tumor erreichte, weist das Fab-Fragment aufgrund seiner geringen Größe (verglichen mit dem mAk) eine schnellere Assoziations-Kinetik zum Tumorantigen als der Antikörper auf (Maximum bereits nach 1 h p.i. erreicht). Die 4 fach höhere Anreicherung des Fab's am Tumor lässt sich wohl mit der besseren Penetration des soliden Tumors aufgrund der Größe des Fab's erklären. Dem Fab-Fragment fehlt jedoch der Fc-Teil, was dazu führt, dass die Bindungsstärke (Avidität) des Fab's im Vergleich zum intakten mAk deutlich herabgesetzt ist und dieser aufgrund dessen auch sehr rasch vom Tumor dissoziiert (nach 6 h sind nur noch 0,5% der injizierten Dosis am Tumor wiederzufinden). Die Ausscheidung des [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA konjugierten Fab-B4 findet fast ausschließlich über die Nieren statt. Nach 6 h p.i. finden sich 52,7% der injizierten Dosis an den Nieren wieder. Zu diesem Zeitpunkt war auch der größte Anteil an [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA konjugiertem Fab-B4 ausgeschieden (nur noch 0,14% ID/g fanden sich im Blut wieder. Über die Leber findet fast kein Abbau des Fab-Konjugates statt ( max. 1,5%ID/g Leber). Die Biodistribution in den Referenzgeweben Muskel, Magen und Darm bleiben zu jedem gemessenen Zeitpunkt niedrig. Somit bindet das [<sup>111</sup>In]Indium-DTPA konjugierten Fab-B4 offensichtlich spezifisch am Tumor und zeigt keine Anreicherung an den zuletzt genannten Organen. Muskel, das Nichttumor Referenzgewebe, weist durchwegs eine niedrige Dosis von maximal 0,07% der ID/g Muskelgewebe auf (Tab. 3.9; Abb. 3.54). Die Szintigramme bestätigen die Biodistributionsdaten: nach 1 h war der Tumor am besten darstellbar und konnte nach 24 h nicht mehr am Tumor in der U87-xenotransplantierten SCID Maus detektiert werden (Abb. 3.55).

Seine klinische Anwendung würde dieses Fab-Fragment v. a. in der Diagnostik finden, da er sich durch seine schnelle Kinetik und spezifische Anreicherung am Tumor als möglicher guter Tracer ausweist. Ebenso könnte er in der lokoregionalen Applikation im Rahmen der RIT eingesetzt werden. Die sehr hohe Anreicherung am Tumor, die auf eine bessere Penetration des Tumors zurückzuführen ist, zeigten, dass das Fab-B4 durch Diffusionsprozesse getragen weiter ins Gewebe einzudringen vermag als ein mAk. Diese Befunde lassen vermuten, dass bei einer lokoregionalen Applikation das konjugierte Fab weiter von der Tumorzelle entfernte Tumorzellen mit dem Radionuklid adressieren könnte.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich monoklonale Antikörper (mAk) gegen *hTNC-1* erzeugt. Es konnten die Bindungseigenschaften dieser Antikörper sowohl *in vitro* als unter physiologischen Bedingungen im Tiermodell getestet werden. Des weiteren wurde ein Fab-Fragment gentechnisch hergestellt und ebenfalls *in vitro* und *in vivo* charakterisiert.

In den semiquantitativ ausgewerteten RT-PCR-Daten konnte eine Korrelation der Expression der *hTNC-1* Isoformen mit dem Tumormalignitätsgrad festgestellt werden. Eine Expression des *hTNC-1* an gesundem Hirngewebe konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Daher wurde die alternativ gespleißte FNIII-A3 Domäne für die Immunisierung von Balb/c Mäusen rekombinant in *E. coli* hergestellt. Es konnten zahlreiche immortalisierte Hybridomaklone nach Fusion der Milzzellen immunisierter Mäuse mit Myelomazellen generiert werden. Von insgesamt sechs charakterisierten mAk erwies sich der Klon WGGD4-B4 als der mit der höchsten Affinität *in vitro* und einer ebenfalls hohen physiologischen Avidität gegenüber der tumorassoziierten Isoform des *hTNC*. Die Zelllinie dieses Klons war auch in der Kultur gut zu halten. Sie konnte ohne Wachstumsrückgang an die serumfreien Kulturbedingungen im Bioreaktor mit gleichbleibender hohen Antikörperproduktionsrate (20 µg/ml Kulturmedium) angepasst werden. Das Ziel, einen mAk zu generieren, der zwischen den einzelnen *hTNC* Isoformen diskriminieren kann und somit nur am tumorassoziierten Antigen (TAA) *hTNC-1* bindet, konnte erreicht werden. Für die Radioimmuntherapie (RIT) steht nun ein mAk zur Verfügung, der in der Lage sein wird, spezifisch und mit hoher Avidität an WHO°III und °IV Gliomen zu binden. Gesunde Hirnareale werden mit diesem mAk nicht adressiert werden. Aufgrund dessen könnten zum einen Nebenwirkungen dieser Therapie, die auf die Beeinträchtigung des gesunden Hirngewebes um die Tumorphöhle herum und die sich durch die Kreuzreaktivität des bisherigen mAk ergaben, minimiert werden. Andererseits könnte eine höhere Konzentration und eine längere Verweildauer des radionuklidkonjugierten mAk an den Tumorzellresten erreicht werden, da der mAk WGGD4-B4 keine Kreuzreaktivität zeigte und unter physiologischen Bedingungen eine höhere Avidität zum Tumor hat als der BC-24. Ein weiterer großer Vorteil des neuen mAk gegenüber dem BC-24 ist die unbegrenzte Verfügbarkeit für die RIT und die kostengünstigere Produktion und Aufreinigung aus den konditionierten serumfreien Kulturmedien des WGGD4-B4. Es können homogene mAk-Lösungen hoher Reinheit und einer hohen Konzentration an funktionalen mAk erreicht werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die gentechnische Herstellung von Fab-Fragmenten für die RIT und für die nuklearmedizinische Bildgebung. Die Intention war, die Vorteile der rekombinanten Antikörpertechnologie zu nutzen. Die Synthese von

Antikörperfragmenten mit der kleinsten Erkennungseinheit und der geringsten Molekülgröße sollte mit dem Ziel erreicht werden, die begrenzte Reichweite eines mAk im Tumorgewebe zu überwinden. Ein wiederkehrendes Rezidiv auch nach der Therapie mit radionuklidkonjugierten mAk entsteht immer in unmittelbarer Nähe des bereits operativ entfernten und therapierten Tumors. Persistierende Resttumorzellen nach RIT könnte man sich dadurch erklären, dass der mAk bedingt durch seine Größe nicht weit genug in den Tumor Rand eindringen kann und somit weiter entfernte Resttumorzellen nicht adressieren kann. Ein relativ kleines Fab-fragment (50 kDa  $\sim$  1/3 mAk) könnte in der Lage sein, durch Diffusionsprozesse getragen auch weiter von der Tumorkhöhle entfernte Tumorzellen mit dem Radionuklid zu adressieren. Der Erfolg der Therapie könnte dadurch gesteigert werden.

Die gentechnische Herstellung von Fab-Fragmenten konnte in dieser Arbeit ebenfalls etabliert werden. Es gelang die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Regionen des mAk WGGD4-B4 mittels 5'-RACE-PCR zu gewinnen und in den Expressionsvektor pASK85-D1.3 zu klonieren. Die Expression dieser wurden unter der Transkriptionskontrolle des tetA Promoter-Systems erreicht, dessen Induzierbarkeit mit Anhydrotetracyclin und dessen exakte Regulierung eine kostengünstige Produktion von Antikörperfragmenten in *E. coli* über den Labor-Maßstab hinaus ohne Toxizitätserscheinungen oder Zelltod ermöglicht. Die IMAC-Reinigung über das Histidinhängsel erleichterte die Isolation der sekretierten, rekombinanten Antikörper aus dem Periplasma von *E. coli*. Die Affinität des derart generierten Fab-Fragments B4 konnte im ELISA ermittelt werden. Die ermittelte Dissoziationskonstante liegt wie für den mAk im nanomolaren Bereich, so dass von einer guten Affinität auch für dieses Fab-Fragment ausgegangen werden kann. Die unter physiologischen Bedingungen an mit der *humanen* Gliomzelllinie xenotransplantierten SCID-Mäusen durchgeführten Untersuchungen zeigten für dieses Fab eine aufgrund seiner geringen Größe bedingte rasche spezifische Anreicherung am Tumor und eine schnelle Ausscheidung. Aufgrund dessen könnte sich dieses Fab-Fragment auch als möglicher Tracer für die nuklearmedizinische Differenzialdiagnostik von Gliomen eignen. Dafür sprechen die spezifische hohe Anreicherung am Tumor (40% ID nach 1 h bei i. v. Gabe) und die rasche Ausscheidung (innerhalb von 6 h p.i.). Die heterologe Herstellung im Labormaßstab in *E. coli* und die IMAC-Reinigung dieses Fab-Fragments konnte ebenfalls in dieser Arbeit etabliert werden, so dass auch dieses Antikörperfragment theoretisch unbegrenzt für die RIT und/oder nuklearmedizinische Diagnostik zur Verfügung steht.

## 6 Materialien

### Versuchstiere

#### Balb/c, weiblich

Für die Immunisierung mit dem rekombinanten C-terminalen Polypeptid *hTNC-1*(P1257-V1421) der tumorspezifischen Isoform des humanen TNC wurden ausschließlich weibliche BALB/c Mäuse in einem Alter von sechs bis acht Wochen verwendet. Die Tiere wurden aus der Zucht der Fa. Charles River, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld bezogen.

Der Tierversuch wurde vom Sachgebiet 54 Verbraucherschutz und Veterinärwesen der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 55.2-1/54-2531.6-7/05 genehmigt.

#### SCID, weiblich

Die Biodistribution der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten monoklonalen, *murinen* Antikörper und deren rekombinanten Fab-Fragmente wurden an mit U87-MG, einer humanen Gliomzelllinie, xenotransplantierten weiblichen SCID-Mäusen evaluiert. Die genaue Bezeichnung der Inzuchtlinie lautet CB17/lcrHsd-Prkdcscid/Crl. Das Alter der Tiere betrug zu Versuchsbeginn sechs bis acht Wochen. Der Tierversuch wurde vom Sachgebiet 54 Verbraucherschutz und Veterinärwesen der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-112-08 genehmigt.

### Zelllinien und Kultivierungsbedingungen

#### Zelllinien

U87-MG	Fa. ATCC : ATCC-HTB-14
P3X63AG8.653	Fa. ATCC: ATCC-CRL-158

#### U87-MG Kultivierungsmedium:

RPMI1640 (Fa. Biochrom)  
2 g/l NaHCO<sub>3</sub>  
300 mg/l Glutamin  
10 % FCS-Gold (Fa. PAA)

#### P3X63AG8.653 Kultivierungsmedium:

RPMI1640+20 mM Hepes (Fa. Biochrom)  
10 % FCS-Gold (Fa. PAA)

**Hybridoma Kultivierungsmedien**

**NM1 (Normalmedium 1):**

RPMI1640+20 mM Hepes (Fa. Biochrom)  
10 % FCS-Gold (Fa. PAA)  
1g/l Glutamin  
5 % Bri Clone (Fa. Archport, Irland)

**NM2 (Normalmedium 2):**

enthält durch das Immunglobulin reduzierte FCS nur noch max. 0,22 µg Rinder-IgG/ml  
RPMI1640+20 mM Hepes(Fa. Biochrom)  
5 % FCS-IgG stripped (Fa. PAA)  
1g/l Glutamin  
5 % Bri Clone (Fa. Archport, Irland)  
10 µM β(2)-Mercaptoethanol

**NM3 (Normalmedium 3):**

RPMI1640+20 mM Hepes(Fa. Biochrom)  
10 % FCS-Gold (Fa. PAA)  
1g/l Glutamin  
5 % Bri Clone (Fa. Archport, Irland)  
5 ml Optimab A (Fa. Invitrogen)  
5 ml Optimab B (Fa. Invitrogen)  
10 µM β(2)-Mercaptoethanol

**Hybridoma-SFM (Fa. Invitrogen):**

chemisch definiertes Medium (enthält 20 µg/ml Insulin und Transferrin)  
0,8 g / Glutamin  
2 g/ Glucose  
10 µM β(2)-Mercaptoethanol (Fa. Invitrogen)

**HAT-Medium (Fa. Biochrom)**

NM1 + 1 x HAT

**HT-Medium (Fa. Biochrom)**

NM1+ 1 x HT

## Bakterienstämme, Kultivierungsbedingungen und Plasmide

### Bakterien

- E. coli* DH5 $\alpha$ : F'/endA1, hsdR17(rK-, mK+), supE44, thi1, recA1, gyrA, (Nal<sup>r</sup>), relA (Ausubel, Brent, *et al.*, 1995) Fa. Novagen
- E. coli* BL21Star(DE3): F-, dcm, ompT, hsdS(rB-, mB-), gal; (DE3) (Studier *et al.*, 1986; Grodberg, *et al.*, 1988) Fa. Novagen
- E. coli* TOP10 (DH10B): F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 endA1 ara $\Delta$ 139  $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK  $\lambda$ - rpsL(Str<sup>R</sup>) nupG Fa. Invitrogen
- E. coli* JM83: F-  $\Delta$  (lac-proAB)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 ara rpsL Fa.

### Medien:

LB, pH 7.0:	Bacto-Trypton	1 %
	Bacto-Yeastextrakt	0.5%
	NaCl	1%
LB+Ampicillin:	Ampicillin	1 ml/l LB
LB-Festmedium:	wie LB + 2 % Top-Agar	
LB-Festmedium+Ampicillin:	wie LB-Festmedium + Ampicillin	

### Antibiotika-Stammlösungen:

Für die Herstellung von Selektivmedien wurden folgende Antibiotika-Stammlösungen verwendet und bei -20 °C gelagert, wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert (0,1  $\mu$ m).

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O	1:1000 zum Medium
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/ml in 70 % Ethanol	1:1000 zum Medium
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml in 100% DMF	1:1000 zum Medium

### Kompetente Zellen :

TFB1-Puffer pH 5.8:	Kaliumacetat	30 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	RbCl	100 mM
	Glycerin	15 %
TFB2-Puffer pH 6.5:	MOPS	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	RbCl	10 mM
	Glycerin	15 %

**Plasmide**

Plasmidname	Genotyp/Eigenschaften/ Verwendung	Referenz
Champion pET151/D-TOPO	AmpR, MCS, lacZ $\alpha$ , 6xHis, TEV, Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe #151-01 Dubendorff, Studier, 1991 Studier <i>et al</i> , 1990
pCR2.1-TOPO	AmpR, KanR, MCS, lacZ $\alpha$ , Klonierungsvektor	Invitrogen, Karlsruhe Shumann, 1991, 1994
pASK85-D1.3	AmpR, 6xHis, OmpA bzw. PhoA, Expressionsvektor für Fab-Frag- mente	Skerra & Plückthun, 1988

**Oligodesoxynukleotide**

Wurden allesamt von der Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen:

5'-NM_002160(4131-4151)	CCA GAT ATG GGA AAC CTC ACA (21 bp)
3'-NM_002160(4622-4773)	CAC CCC ATA GAT GGA GAC TC (20 bp)
5'-NM_002160(4752-4773)	ATC TTC GAG ACC TTT ACC ATT G (22 bp)
3'-NM_002160(5350-5329)	GGC TCA GAC TGC TTT TTG GTA T (22 bp)
5'-h $\beta$ -ActinX00351(235-255)	TGG GAC GAC ATG GAG AAA ATC (21 bp)
3'-h $\beta$ -ActinX00351(779-798)	GAA GGA AGG CTG GAA GAG TG (20 bp)
5'-TOPO-A3	CAC CCC AGA TAT GGG AAA CCT CAC A (25 bp)
3'-TOPO-A3-TAG:	TAC/ACC CCA TAG ATG GAG ACT C (22 bp)
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG (20 bp)
T7 term	CTA GTT ATT GCT CAG CGG T (19 bp)
5'-VH1	SAR GTN MAG CTG SAG SAG TC (20 bp)
5'-VH2	SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG (23 bp)
3'-VCH1-IgG3	AGG GAC CAA GGG ATA GAC AGA TGG (24 bp)
3'-CL	GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC (21 bp)
5'-VL	GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA (24 bp)
LC-FR1-FW	GAT GTz GTz ATG ACz CAR ACz CC (z = INO) (23 bp)
HC-FR1-FW	GAR GTz MAG CTz GAz CAG TCz GG (z = INO) (23 bp)
HC-FR1-FW-1	GAG GTG CAG CTG GAG GAG T (19 bp)
HC-FR1-FW-2	GAG GTG MAG CTG GzG GAz T (z = INO) (19 bp)
HC-FR4-RW	ACz GAT GGG GCT GTz GTT TGG(z = INO) (21 bp)
GSP1(X00915:H86-L93)	CAA CTC AGT CTT GCT GGC TGG G (22 bp)
GSP2(X00915:W41-S48)	TGG ACA GGG CTC CAT AGT TCC (21 bp)
HC-FR1-all IgG-FW	GAZ GTZ CAZ TTZ GTZ GAZ TGZ GG (z = INO) (23 bp)
GSP_LC_3(P2-P9)	GGT GGG AAG ATG GAT ACA GTT GG (23 bp)
GSP_LC_2(V21-28)	GAA GTT GTT CAA GAA GCA CAC G (22 bp)
GSP_LC_1(V39-45)	CTG CCA TCA ATC TTC CAC TTG AC (23 bp)



---

LC-B4-SacI-FW	GAT GTC GAG CTC ACC CAG TCT C (22 bp)
LC-B4-XhoI-RW	TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC AG (23 bp)
HC_B4-2_PstI	ATC CAG CTG CAG CAG TCT GGA C (22 bp)
HC_B4-2_BstEII	AGA GAC GGT GAC CAG AGT CCC T (22 bp)

## Chemikalien

5-Brom-4-chloro-3-in ~ X-gal	Merck, Darmstadt
Adv. 2 PCR Kit	Clontech, Frankreich
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Alkalische phosph. Substrat Kit	Bio Rad, München
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillinsodiumsalt	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anhydrotetracyclinhydrochlorid	Acros Organics, Nidderau
Antibiotik-Antimycotic	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Anti-Mouse-IgG alkal. Phosphatase	Sigma-aldrich, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol, Zellkultur	Invitrogen, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Betainemonohydrat	Fluka, Sigma-aldrich, Taufkirchen
Biocidal ZF	Wak-Chemie, Steinbach Ts
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BriClone	Archport, Dublin, Irland
Brilliant Blue R250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA	Invitrogen, Karlsruhe
Butan/Propan-Gasgemisch	VWR, Ismaning
CaCl <sub>2</sub> -Sol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CD-Hybridoma	Invitrogen, Karlsruhe
CellLytic MT 2x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, München
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ClonaCell	CellSystems, St. Katharinen
Clonacell-Hybridoma/Medium A	StemCell Technologies, St. Katharinen
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
Criterion Precast Gel 4-20%	Bio Rad, München
Dako-Kit (LSAB-Kit-System-HRP)	Dako, Hamburg
DeoxyribonukleaseI Rnase-free100U	Fermentas, St. Leon-Rot
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dimethyl Pinelimidate DiHCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Biochrom AG, Berlin
DNA ladder 100 bp	NEB, Frankfurt am Main
DNA ladder 1 kb	NEB, Frankfurt am Main
DNA Loading buffer, 10x	Eppendorf, Hamburg
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol 100%	Apotheke LMU
Ethanol, vergällt 70%	Apotheke LMU
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Extractor for Eth.Br.Dec.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FBS IgG-stripped	PAA, Pasching Österreich
FBS Gold	PAA, Pasching Österreich
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Freund`s Adjuvant, C.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Freund`s Adjuvant, I.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fungizone Antimycotic	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin
GigaseptAF	Schülke&Mayer
Glutaraldehyde50%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	ROTH, Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycine for elektroph.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GAM HRP konj. mAk	Bio Rad, München
GAM alk. Phosphatase konj. mAk	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Guanidin-HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HAT Supplement 50x	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
HCl 1M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hi Trap Desalting 5 ml	GE Healthcare, München
Hi Trap Protein A Säule 1ml	GE Healthcare, München
His Trap FF crude Säule 1ml	GE Healthcare, München
Histoacryl	Braun, B/Braun Onlineshop
HRP Substrate	Bio Rad, München
HT Supplemen 100x	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Hybridoma-SFM	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Illustra plsmidPrep Mini Spin Kit	GE Healthcare, München
Imidazol	Merck, Darmstadt
Immun-Blot AP Assay Kit	Bio Rad, München

---

Immun-Star GAM-HRP	Bio Rad, München
Insulin-Transferrin-Sodiumselenite	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Interleukin 6	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IPTG-Solution 100 mM	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Chloramphenikol 5 mg/ml	Biochrom AG, Berlin
Ketamin Inresa	Apotheke LMU
Laemmli Sample Buffer	Bio Rad, München
L-Glutamin 200 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Loading Dye Solution 6x	Fermentas, St. Leon-Rot
Lumi-Light Plus	Roche, Pensberg
Luria Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Luria Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Luria Broth	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mangan(II)Chlorid-Lösung, 1M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgCl <sub>2</sub> -Lösung, 1M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MgSO <sub>4</sub> -Lösung, 1M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver Blotting Grade	Roth, Karlsruhe
MOPS	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
NaOH Pellets	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Native Sample Buffer	Bio Rad, München
NiCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ni-NTA Spin Kit	Quiagen, Hilden
N,N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nitrocellulose/Filter P. 0,2 µm	Bio Rad, München
Optimab A und B 100x	Invitrogen, Karlsruhe
Paraffin	Monoject Scientific Inc., Irland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS 10x, steril, ohne Ca/Mg	Biochrom AG, Berlin
PD-10 Col. Sephadex G-25 M	GE Healthcare, München
PEG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Pierce Rapid Antibody Isotyping plus lambda mouse Kit	Thermo Sciencific, Bonn

pH-Indikatorstäbchen	Merck, Darmstadt
Polyethylenglycol 8000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Potassiumacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Potassiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Precision Plus Marker	Bio Rad, München
Precision Plus Prot. Unstained	Bio Rad, München
Precis. Plus Prot. Kaleidos. Stand.	Bio Rad, München
Precis. Prot. Strep-Tactin AP-Konj.	Bio Rad, München
ProtoScript First Strand cDNA Kit	NEB, Frankfurt am Main
Sequenzierung, Premiumrun 750 bp	Sequiserve, Vaterstetten
Sequenzierung, Longrun 950 bp	Sequiserve, Vaterstetten
Prestained SDS-PAGE Standard	Bio Rad, München
Protease Inh. Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein A Antibody Purification Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ProtoScript First strand cDNA	NEB, Frankfurt am Main
PVDF Membran	Roche, Pensberg
Onestep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
5'-RACE System for Rapid Ampl. of cDNA Ends	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsnuklease BstEII 10 000U/ml	NEB, Frankfurt am Main
Restriktionsnuklease PstI20 000U/ml	NEB, Frankfurt am Main
Restriktionsnuklease SacI-HF20 000U/ml	NEB, Frankfurt am Main
Restriktionsnuklease XhoI20 000U/ml	NEB, Frankfurt am Main
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rnasy away	Invitrogen, Karlsruhe
Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)	Provet AG (Clinipharm), Lyssach Schweiz
RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
RPMI1640 mit HEPES	Biochrom AG, Berlin
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure, konz.	Roth, Karlsruhe
SC-DNA Ladder	Stratogene
SDS-Lsg 10%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Silbernitrat AgNO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium acetate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium carbonate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium chloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Sodium phosphate Dibasic H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium Phosphate Monobasic	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodium sulfite	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodiumdodecylsulfat SDS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sodiumhypophosphitemonohydrate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue-Tek® O.C.T.Compound	Sakura Finotek, Niederlande
T4 DNA Ligase 100U	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase 200U	Fermentas, St. Leon-Rot
TEV Protease 1000U	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure TCA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triethanolamine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris/Glycine 10 x	Bio Rad, München
Tris/Glycine/SDS, 10x	Bio Rad, München
Tris-Boreate-EDTA buffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Buffered Saline, 10x	Bio-Rad, München
TritonX-100	ROTH, Karlsruhe
Trizma-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma-hydrochloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIZOL	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan-Blue Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Biochrom AG, Berlin
Tryptone-Peptone	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
UHU Sekundenkleber	Bürobedarf
Urea	Bio Rad, München
Vecta Mount, Eindeckmedium	Vector Laboratories, Peterborough
Venor GeM Myco-Diagnostik	Biochrom AG, Berlin
Wasser, ddH <sub>2</sub> O, steril	Fresenius Kabi
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Zinc sulfate solution 2M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zitronensäuremonohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylol	Merck, Darmstadt
Radionuklid [ <sup>123</sup> I]Iod	GE Healthcare, München

## Lösungen

### Molekularbiologische Methoden:

EB-Puffer:	Tris-HCl, pH 8,5	10 mM
TE-Puffer:	Tris-HCl, pH 8,5	10 mM

## Materialien

---

10xTBE-Laufpuffer:	Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 7,5	1 mM
	Tris-Base	89 mM
	Borsäure	89 mM
	Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8,0	2 mM
10x Probenpuffer (loading buffer):	Glycerin	50 %
	Na <sub>2</sub> -EDTA	1 mM
	Bromphenolblau	4 mg/l
	Xylencyanol	4 mg/l
DEPC-H <sub>2</sub> O:	DEPC	0,1 %
Ethidium Bromid:	Ethidium Bromid	10 mg/ml

### Proteinbiochemische Methoden:

#### SDS-Page:

6x Lämmli-Auftragspuffer:	Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
	Glycerol	25 %
	Bromphenolblau	0,01 %
	SDS	2 %
10x SDS-Laufpuffer (Lämmli):	TRIS-HCl, pH 8,3	25 mM
	SDS	0,1 %
	Glycin	192 mM
10 x Boreate-Laufpuffer:	Tris-Base pH 8,3	100 mM
	Borsäure	100 mM
	SDS	0,1 %

#### Coomassie-Färbung:

Coomassie-Lösung:	Coomassie Brilliant Blue	0,2 %
	Coomassie-Entfärber	99,8 %
Coomassie-Entfärber:	Methanol	45 %
	Essigsäure	10 %

#### Silberfärbung eines SDS-Gels:

Fixierlösung 1:	Ethanol	30 %
	Essigsäure	10 %
Fixierlösung 2:	NaAcetat	0.4 M
	Essigsäure	0.5 %
	EtOH	30 %
	Glutaraldehyd	2 %
	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	15 mM

Färbelösung:	AgNO <sub>3</sub>	1 %
	Formaldehyd	0,03 %
Entwickler-Lösung:	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	50 mM
	Formaldehyd	0,03 %
Stopplösung:	Na <sub>2</sub> -EDTA pH 8.0	50 mM
<b>Western Blot:</b>		
10 x Transferpuffer:	Glycin	192 mM
	Tris-HCl, pH 8.3	25 mM
	SDS	0,1 %
1 x Transferpuffer:	10xTransferpuffer	100 ml
	Wasser	700 ml
	Methanol	200 ml
1 x Boreate-Blotting Buffer:	10 x Boreate-Laufpuffer	10 %
	Methanol	20 %
	ddH <sub>2</sub> O	70 %
10 x TBS (Wasch-Puffer):	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
	NaCl	500 mM
1 x TBST:	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
	NaCl	500 mM
	Tween 20	0,1 %
Blockierlösung:	fettfreies Milchkpulver	5 %
	1 x TBS	95 %
Inkubationslösung:	fettfreies Milchkpulver	5 %
	1 x TBS	95 %
Stripping-Puffer:	Tris-HCl, pH 6,7	62,5 mM
	SDS	2 %
	β-Mercaptoethanol	100 mM
Ponceau-Lösung:	Ponceau S	0,1 %
	Essigsäure	5 %
<b>ELISA:</b>		
1 x PBS, pH 7,2 oder pH 9,0:	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 mM
1 x PBS-T, pH 7,2:	NaCl	137 mM

## Materialien

---

	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 mM
	Tween 20	0,1 %
Antigen-Lösung (10 µg/ml):	Antigen	1 %
	1 x PBS	99 %
Blockierlösung:	BSA	5 %
	1 x PBS	95 %
Inkubationslösung Antikörper:	BSA	0,5 %
	1x PBS	95%
Substratlösung:	pNPP	10 mg
	5 x Diethanolamine Buffer	2 ml
	ddH <sub>2</sub> O	8 ml
Blockier-Lösung	BSA	5 %
1 M Tris-HCl, pH 8.0:	Tris-HCl	121,12 g/l
0.5 M Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8.0:	Na <sub>2</sub> -EDTAx2H <sub>2</sub> O	186.2g/l
<b>Expression in <i>E. coli</i>:</b>		
Induktor-Stammlösung 1:	IPTG in H <sub>2</sub> O:	100 mM
Induktor-Stammlösung 2:	Anhydrotetracyclin in DMF:	5 mg/ml
Puffer B, pH 8.0:	Urea	8M
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1M
	Tris-HCl	0.01M
Puffer C, pH 6.3:	wie Puffer B	
Puffer D pH 5.9:	wie Puffer B	
Puffer E pH 4.5:	wie Puffer B	
Periplasma Aufschlußpuffer:	Saccharose	500 mM
	Tris/HCl pH 8,0	100 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
IMAC-Puffer:	NaPi pH 7,5	50 mM
	Betain	0.5 M
	pH 7,5	
Elutionspuffer:	NaPi pH 7,5	50 mM
	Betain	0.5 M
	Imidazol	0 – 300 mM



**Affinitätsgereinigte mAk gewinnen:**

Binding/Wasch-Puffer, pH 7.0:	NaP <sub>i</sub>	20 mM
	NaCl	0,5 M
Elutionspuffer pH 3,0:	Glycin/HCl	0,1 M

**Geräte**

ÄKTA-FPLC	GE Healthcare, Freiburg
UV-Detektor UPC-900	
Sampler Frac900	
Lichtmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Jena
CCD-Kamera AxioCam Mrc5	Carl Zeiss AG, Jena
Brutschrank CB150	Binder, Tuttlingen
Cycler advanced primus 25	peqLab, Erlangen
Elektrophorese-Kammer/horizontal	peqLab, Erlangen
PerfectBlue Gelsystem Mini M	
PerfectBlue Gelsystem Mini L	
Elektrophorese-Kammer CriterionCell	BioRad
Thermodrucker UP-897MD	Sony, Berlin
HPLC 1100 (mit UV Detektor)	Agilent, Waldbronn
Lichtmikroskop Typ 9901	Zeiss, Göttingen
Multiscan EX, ELISA-Reader	Thermo Electron Corp., Karlsruhe
Orbital-Shaker, 7-0030	neoLab, Heidelberg
Petriturn-E Petrischalen Drehtisch	Schütt, Göttingen
Pipettboy, inkl. Ladestation	VWR, Ismaning
Semi-Dry Transfer Cell	Biorad, München
Steril-Autoklav Systek DX-23	Systec, Wettenberg
Sterilwerkbank, Herasafe	Kendro, Worms
Photometer, Ultrospec1100pro	GE Healthcare, Freiburg
Wasserbad, Typ 3042	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Rotor, FA-45-30-11	
Rotor, A-4-62	
Rotor, F-34-638	
Zentrifuge Sorvall RC 5B und RC 5C Plus	Kendro, Worms
Rotor, SS-34	
Rotor SLA-1500	
Tischzentrifuge, FVL-2400	peqLab, Erlangen
Schüttelinkubator, E2-20	peqLab, Erlangen

Ph-Meter, WTW 730	Inolab, Goldbach
Ph-Elektrode, Inlab Micro	Mettler Toledo, Giessen
Heizrührer, RTC basic	IKA, Staufen
Thermomixer comfort,	Eppendorf, Hamburg
Waage, CP 2245	Sartorius, Göttingen
Gelimager, Geneflash	Syngene, Cambridge
UV Transilluminator, GelVU	
Gamma counter, Cobra Quantum	Packard, Camberra
Kryostat, CM-1510-1	Leica, Nussloch
DC-Scanner, MiniGITA	Raytest, Straubenhardt
Peristaltische Pumpen,P1	GE Healthcare, Freiburg
Microwellenofen, Micromaxx MM 6460	Cybercom, Stockholm
Power Supply Power Pac 300	BioRad, München
Power Supply, EV 265	peqLab, Erlangen
Bandelin Sonoplus UW2070	Bandelin, Berlin
Schallschutz, LS6	
Gewebehomogenisator, Ultra-turrax T8	IKA, Staufen
Bunsenbrenner, 470	Roth, Karlsruhe
Pipettboy, inkl.Ladestation	VWR, Ismaning
Eppendorf Pipette	VWR, Ismaning
variabel 0,1-2,5 µl, 2-20 µl,	
20-300 µl, 200-1000 µl	

## Verbrauchswaren

Acrodisc 0,2 µM steril	VWR, Ismaning
BD Falcon Röhrchen 15, 50 ml	Falcon, Gräfelfing
Biomax MR Filme Kodak, 18x24cm	VWR, Ismaning
Bioreaktor MiniPerm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cell Stainer, 100µm	Falcon, Gräfelfing
Centricon YM-3, -5, -30, 3 000 – 30 000 MWCO	Millipore, Schwalbach
Combi-Max mit Deckel autoklavierbar	VWR, Ismaning
Combi-Rack mit Deckel autoklavierbar	VWR, Ismaning
Coverslips	Nunc, Wiesbaden
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, VWR, Ismaning
Cryo-Aufbewahrungsbox	Roth, Karlsruhe
Cryo-Stifte	VWR, Ismaning

Dampfsterilisationsbad	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen, 20x20mm	Roth, Karlsruhe
Drigalski-Spatel	Roth, Karlsruhe
Druckfilter Acro Cap 0.1 o. 0,2 µM steril	VWR, Ismaning
Enghalsflasche, 250ml	VWR, Ismaning
Entsorgungsbeutel, 200x300	VWR, Ismaning
Entsorgungsbeutel, 30µm	Roth, Karlsruhe
epT.I.P.S Reloads, steril, versch. Größen	eppendorf, Hamburg
epT.I.P.S PCRclean, versch. Größen	eppendorf, Hamburg
Extra Thick Blot Paper, 8x13cm	Bio Rad, München
Gasdurchlässiger Verschlussfilm, steril	Roth, Karlsruhe
Gaskartusche, Typ CV470	Roth, Karlsruhe
Handstückzähler, Zellkultur	Zefa, Harthausen
Hirschmann Hämatokritröhrchen, heparinisiert, 2µl	VWR, Ismaning
Lab-Mate PD-10 Buffer Reservoir	GE Healthcare, München
Laborflasche Duran, 250, 500 ml, 1 l	VWR, Ismaning
Laptop Kühler, -15°C/1h	VWR, Ismaning
Magnetrührstab-Set, 12-teilig	VWR, Ismaning
Mikro-Schraubröhre, 2ml, Cryo-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
MultiCast Gießschiene Mini L	peqLab, Erlangen
Multidishes, steril, 6-well, 24-well, 96-well	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulose Membran/Filter P. Sandwich, 0,2µm	Bio Rad, München
Nunclon Flask Filter Caps, 25, 80, 175 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
Objektträger, silanisiert	Dako, Hamburg
Objektträgerkasten, 100 Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Riedel de Haen, Seelze
Pasteurpipetten	Apotheke, LMU
PCR Tubes Flat Cap, PCRclean, 0,2ml	peqLab, Erlangen
Petrischale mit Deckel, D:10cm, H:2cm	Apotheke, LMU
Pipettierhelfer macro	VWR, Ismaning
Pipette serologisch, 1, 10, 25 ml	VWR, Ismaning
Pipettenstation	VWR, Ismaning
pH-Indikator Stäbchen, nicht blutend	Zefa, Harthausen
Reagenzbehälter 1,5 ml, Safe-Lock/PCRclean	eppendorf, Hamburg
Reagenz-Behälter PVC, für Mehrkanalpipetten	VWR, Ismaning
Röhre-Zweistufen-Belüftung, 13ml, 100x16mm	Sarstedt, Nümbrecht
Rotilab Gewichts-u.Stab.ringe	Roth, Karlsruhe
Rotilab-Instrumententabletts	Roth, Karlsruhe
Rotilab-Mikrohomogenisatoren	Roth, Karlsruhe

Skalpell steril	VWR, Ismaning
Ständer für Vernichtungsbeutel, H.250mm	Roth, Karlsruhe
Sterilkompressen, einzeln verpackt, 5 x 5 cm	NOBA-Verbandmittel, Wengern
Stripetten, Filter/steril/verw. Gr.	Costar, London, England
UV-Küvette, mikro 15 mm, 70-850µl	Brand, Wertheim
Animal Enrichment, alpha-twist 8 lb.	Pharmaserve, Framingham, USA
Animal Enrichment, Shepard Shacks Regular	Pharmaserve, Framingham, USA

### Computerprogramme und Datenbank

Database & Software	URL	Description
GenBank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	Nukleotid- und Proteine-Sequenz-Datenbanken aller bekannter Proteine
SWISS-PROT	<a href="http://www.expasy.ch/sprot">www.expasy.ch/sprot</a>	Protein-Sequenz-Datenbank (EMBL) verlinkt mit zahlreichen weiteren Datenbanken und Sequenzbearbeitenden Software
EMBL Nucleotide Sequence Database	<a href="http://www.ebi.ac.uk/embl.html">www.ebi.ac.uk/embl.html</a>	Nukleotid- und Proteine-Sequenz-Datenbanken aller bekannter Proteine
IHOP	<a href="http://www.ihop-net.org/">http://www.ihop-net.org/</a>	Bietet zahlreiche Software zur Analyse von Proteinsequenzen
ClustalW2	<a href="http://services.uniprot.org/clustalw/clustalw2-20100701-1001543589">Http://services.uniprot.org/clustalw/clustalw2-20100701-1001543589</a>	Software zum Vergleich von Nukleotid- und Proteine-Sequenzen
VBASE2	<a href="http://www.vbase2.org">www.vbase2.org</a>	an integrative V gene database.
IgBLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/intro.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/intro.html</a>	Datenbank die nur bekannte Ig-Geninformationen enthält mit Software zum Vergleich der eigenen Sequenzen mit denen dieser Datenbank; Greift auf Kabat-, IMGT-, VBASE2-Datenbank zurück
Kabat Database	<a href="http://www.kabatdatabase.com/">http://www.kabatdatabase.com/</a>	Datenbank bekannter Ig-Gene
IMGT	<a href="http://imgt.cines.fr/">http://imgt.cines.fr/</a>	consists of sequence databases, genome database, structure database of germline immunoglobulins, and monoclonal antibodies database
Gene Tools	Gel analysis software	Syngene, Cambridge, UK

## 7 Abkürzungen

### Aminosäuren

<b>A:</b> Alanin	<b>M:</b> Methionin	<b>C:</b> Cystein	<b>N:</b> Asparagin
<b>D:</b> Aspartat	<b>P:</b> Prolin	<b>E:</b> Glutamat	<b>Q:</b> Glutamin
<b>Y:</b> Tyrosin	<b>R:</b> Arginin	<b>G:</b> Glycin	<b>S:</b> Serin
<b>H:</b> Histidin	<b>T:</b> Threonin	<b>I:</b> Isoleucin	<b>V:</b> Valin
<b>K:</b> Lysin	<b>W:</b> Tryptophan	<b>L:</b> Leucin	<b>F:</b> Phenylalanin

<b>A</b>	Adenin
<b>AB</b>	Antibiotikum
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Acc.nr.</b>	Accession number
<b>Ag</b>	Antigen
<b>amp</b>	Ampicillin, $\alpha$ -D-Aminobenzylpenicillin
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>As</b>	Aminosäure(n)
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BCIP</b>	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>Bq</b>	Bequerel
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>BSA</b>	Bovines Serum-Albumin
<b>cam</b>	Chloramphenicol
<b>cDNA</b>	copy DNA
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>d</b>	Desoxy-
<b>dATP</b>	Desoxy-Adenosintriphosphat
<b>Da</b>	Dalton
<b>dCTP</b>	Desoxy-Cytosintriphosphat
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destiliertes Wasser
<b>DEPC</b>	Diethylaminoethan
<b>dGTP</b>	Desoxy-Guanosintriphosphat
<b>d. h.</b>	das heisst
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium

## Abkürzungen

---

<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleicacid
<b>dNTP's</b>	Desoxynukleotidtriphosphat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>dTTP</b>	Desoxy-Thymidintriphosphat
<b>ea.</b>	each, <i>engl.</i> jedes
<b>ECM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assay
<b>et al.</b>	<i>et alii:</i> und andere
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>EtBr</b>	Ethidiumbromid, 3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenanthridiumbromid
<b>FBS</b>	fetal bovin serum
<b>FCS</b>	fötales Kälber-Serum
<b>FITC</b>	Fluoreszein Isothiocyanat
<b>FN</b>	Fibronectin
<b>F(ab')<sub>2</sub></b>	Fragment antigen bindung
<b>°C</b>	SI-Einheit für Temperatur Grad Celsius
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Guanin
<b>H</b>	Stunde(n)
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography
<b>His</b>	Histidin
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase, Meerrettich Peroxidase
<b>HEPES</b>	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinol]-ethansulfonsäure
<b>HAT</b>	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
<b>HT</b>	Hypoxanthin-Thymidin
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IgG</b>	Immunglobulin der Klasse G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>i. p.</b>	intraperitoneal
<b>IPTG</b>	Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>Kan</b>	Kanamycin
<b>kb</b>	kilo Basenpaare

---

<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>Konz.</b>	Konzentration
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria-Bertani (ein Komplexmedium)
<b>Lsg.</b>	Lösung
<b>μ</b>	micro
<b>m</b>	Milli-(1x10 <sup>-3</sup> ), Meter
<b>'</b>	Minute
<b>M, mM</b>	Molar, Millimolar – SI-Einheit für molare Masse (mol/l)
<b>mAk</b>	Monoklonaler Antikörper
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid
<b>M-MLV</b>	Moloney Murine Leukemia Virus
<b>NaCl</b>	Natriumchloride
<b>Na-EDTA</b>	Natrium- Ethylendiamintetraacetat
<b>NBT</b>	Nitro Blue Tetrazolium
<b>NC</b>	Nitrocellulose
<b>NEBuffer</b>	New England Biolabs Puffer 1 – 4
<b>Ni<sup>2+</sup>-NTA</b>	Nickel-Nitrilotriacetat
<b>Nukleotid-Basen</b>	
	<b>A:</b> Adenin, <b>G:</b> Guanin, <b>U:</b> Uracil, <b>C:</b> Cytosin, <b>T:</b> Thymidin
<b>Oligo</b>	18 - 25er Nukleotide-Sequenz
<b>Oligo-dT<sub>12-18</sub></b>	Oligo-desoxy-Thymidin (12-18 Nukleotide)
<b>OD</b>	optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge [nm]
<b>ORF</b>	Offener Leserahmen
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion
<b>pH</b>	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
<b>Primer</b>	kurzes Oligonukleotid
<b>RNA</b>	Ribonucleicacid
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RPM, rpm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Insititute
<b>RPMI1640</b>	am Roswell Park Memorial Insititute entwickelte Medium 1640
<b>RT</b>	Raum Temperatur 24 °C
<b>RT-PCR</b>	reverse Transkription gefolgt von einer PCR

## Abkürzungen

---

<b>SDS</b>	Natrium-Dodecylsulfat
<b>SDS-PAGE</b>	Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>''</b>	Sekunde
<b>SPF</b>	specific pathogen free (Tierhaltung)
<b>s.c.</b>	sub cutan
<b>SI</b>	Système international d'unités, Internationales Einheitensystem
<b>TAE</b>	Tris-Acetat/Na- EDTA-Puffer
<b>TBE</b>	Tris-Borsäure-EDTA-Lösung
<b>Taq Pol.</b>	Thermus aquaticus Polymerase
<b>T</b>	Thymin
<b>TK</b>	Thymidinkinase
<b>TFB</b>	Transformationspuffer
<b>TE</b>	Tris/HCl/EDTA-Puffer
<b>Tris-HCl</b>	Tris-hydroxymethylaminomethan
<b>Tris-Base</b>	Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
<b>Tween 20</b>	Polyoxylethylen(20)-sorbitanmonolaurat
<b>ÜN</b>	über Nacht
<b>U</b>	Unit (Einheit der Enzyaktivität)
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>u.U.</b>	unter Umständen
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	Verhältnis Volumen/Volumen
<b>w</b>	Gewicht
<b>w/v</b>	Verhältnis Gewicht/Volumen
<b>x g</b>	x-fache Erdbeschleunigung (Zentrifugalkraft Zentrifugen)
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>ZM</b>	Zellmembran





## 8 Literatur

- Aatsinki, J. T., Pietila, E. M., und Rajaniemi, H. J.** (1994) A coupled one-step reverse transcriptase PCR procedure for generation of full-length open reading frames. *Bio Techniques* 16: 282-288
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H.** (2008) *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. Saunders Verlag: 3rd edition
- Akamatsu, H., Ichihara-Tanaka, K., Ozono, K., Kamiike, W., Matsuda, H., Sekiguchi, K.** (1996) Suppression of transformed phenotypes of human fibrosarcoma cells by overexpression of recombinant fibronectin. *Cancer Res.* 56: 4541-6
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** (2005) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*: Wiley-VCH, 3. Auflage
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402
- Anbazhagan, R., Skura, T., Gusterson, B. A.** (1990) The distribution of immunoreactive tenascin in the epithelial-mesenchymal junctional areas of benign and malignant squamous epithelia. *Virchows Arch* 59: 59-63
- Aufderheide, E., Chiquet-Ehrismann, R., Ekblom, P.** (1987) Epithelial-mesenchymal interactions in the developing kidney lead to expression of tenascin in the mesenchyme. *J. Cell Biol.* 105: 599-608
- Ausubel, M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, G. und Struhl, K.** (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York
- Baar, J.** (1999) Clinical applications of dendritic cell cancer vaccines. *Oncologist* 4: 140–144
- Bailey, P. und Cushing H.** (1925) Microchemical Color Reactions as an aid to the identification and classification of brain tumors. *PNAS* 11(1): 82-4
- Baneyx, F.** (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 411-421
- Basler, M. und Groettrup, M.** (2007) Links Advances in prostate cancer immunotherapies. *Drugs Aging* 24(3): 197-221
- Behrem S, Zarkovic K, Eskinja N, Jonjic N.** (2005) Distribution pattern of Tenascin C in glioblastoma: correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation. *Pathol Oncol Res* 11: 229-35

- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R., Horwitz, A. H.** (1988) Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240: 1041-3
- Biedermann, K. A., Sun, J. R., Giaccia, A. J., Tosto, L. M., Brown, J. M.** (1991) Scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *PNAS* 88(4): 1394-7
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 24;7(6): 1513-23
- Bjerrum, O. J. und Schafer-Nielsen, C.** (1986) In: Dunn M. J., Editor, *Analytical Electrophoresis*. Verlag Chemie, Weinheim: 315
- Black, P.** (1998) Management of malignant glioma: role of surgery in relation to multimodality therapy. *J. Neurovirol.* 4: 227-36
- Black, P. M.** (1991a) Brain tumors. Part 1, *N. Engl. J. Med.* 324: 1471-6
- Black, P. M.** (1991b) Brain tumor. Part 2, *N. Engl. J. Med.* 324: 1555-64
- Black, P.M.** (2000) Surgery for cerebral gliomas: past, present, and future. *Clin. Neurosurg.* 47: 21-45
- Bosma, M., Schuler, W., Bosma, G.** (1988) The SCID mouse mutant. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 137: 197-202.
- Bosma, G.C., Davisson, M. T., Ruetsch, N. R., Sweet, H. O., Shultz, L. D., Bosma, M. J.** (1989) The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. *Immunogenetics* 29(1): 54-7
- Bourdon, M. A., Wikstrand, C.J., Furthmayr, H., Matthews, T. J., Bigner, D.D.** (1983) Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res.* 43: 2796-805
- Bowden, G. A. und Georgiou, G.** (1990) Folding and Aggregation of  $\beta$ -lactamase in the periplasmic space of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 265, 16760-16766
- Brauckmann, B.** (2006) In die Blutbahn eingespritzte, selektive Antikörper markieren den Weg zum Tumor. *Hauszeitung des D-CHAB. Molekülmix* 6/2006
- Bristow, J., Tee, M. K., Gitelman, S. E., Mellon, S. H., Miller, W. L.** (1993) Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J. Cell Biol.* 122: 265-78
- Bronner-Fraser, M.** (1988) Distribution and function of tenascin during cranial neural crest development in the chick. *J. Neurosciences Res.* 21: 135-47
- Burnet, N. G. und Taylor, R. E.** (1997) Malignant cerebral glioma. Modern radiotherapy techniques are needed to spare normal brain tissue. *BMJ* 314: 900-1
- Carnemolla, B., Castellani, P., Ponassi, M., et al.** (1999) Identification of a glioblastoma-associated Tenascin C isoform by a high affinity recombinant antibody. *Am. J. Pathol.* 154: 1345–1352.

- Carter, P. und Merchant, A. M.** (1997). Engineering antibodies for imaging and therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 449-454
- Chiquet, M., Fambrough, D. M.** (1984) Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J. Cell Biol.* 98: 1926-36
- Chiquet-Ehrismann, R., Mackie, E. J., Pearson, C.A., Sakakura, T.** (1986). Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47: 131-9
- Chiquet-Ehrismann, R., Kalla, P., Pearson, C. A., Beck, K., Chiquet, M.** (1988) Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 53: 383-90
- Chiquet-Ehrismann, R., Matsuoka, Y., Hofer, U., Spring, J., Bernasconi, C., Chiquet, M.** (1991) Tenascin variants: differential binding to fibronectin and distinct distribution in cell cultures and tissues. *Cell Regul.* 2: 927-38
- Chiquet-Ehrismann, R.** (2004) Molecules in focus: Tenascins. *Int. J. of Biochem. & Cell Biol.* 36: 986–990
- Chomczynski, P.** (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Bio. Techniques* 15(3): 532-537
- Chuong, C. M. und Chen, H. M.** (1991) Enhanced expression of neural cell adhesion molecules and tenascin (cytotactin) during wound healing. *Am. J. of Path.* 138: 427-440
- Chung, C. Y., Zardi, L., Erickson, H. P.** (1995) Binding of Tenascin C to soluble fibronectin and matrix fibrils. *J. Biol. Chem.* 270: 29012-7
- Coley, W.** (1909) The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigius*. John Bale & Sons Publishers, London
- Collet, J. F. und Bardwell, J. C.** (2002) Oxidative protein folding in bacteria. *Mol. Microbiol.* 44: 1-8
- Cortez-Retamozo, V., Lauwereys, M., Hassanzadeh, Gh. G., Gobert, et al.** (2002). Efficient tumor targeting by singledomain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer* 98, 456-462
- Cranenburgh, R. M.** (2004) An equation for calculating the volumetric ratios required in a ligation reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 200–202
- Davico Bonino, L., De Monte, L. B., Spagnoli, G. C., et al.** (1995) Bispecific monoclonal antibody anti-CD3 x anti-tenascin: an immunotherapeutic agent for human glioma. *Int. J. Cancer* 61: 509-15
- Devaux, B. C., O'Fallon, J. R., Kelly, P. J.** (1993) Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms. A retrospective study of clinical parameters, therapy, and outcome. *J. Neurosurg.* 78: 767-75

- Donoghue, J. A., Bardies, M., Wheldon, T. E.** (1995) Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *J. Nucl. Med.* 36: 1902-1909
- Dost, F.** (1968) *Grundlagen der Pharmakokinetik*. Thieme Verlag, Stuttgart
- Dorries, U. und Schachner, M.** (1994) Tenascin mRNA isoforms in the developing mouse brain. *J. Neuro-science Res.* 37: 336-47
- Drenckhahn, D. und Kugler, P.** (1994) Bindegewebe. *Systematik der Gewebe*. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore. Anatomie, In: Benninghoff (Hrsg.): 15. Aufl., Bd I: 124-41
- Dubendorff, J. W. und Studier, F. W.** (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219: 45-59
- Edman, P.** (1949): A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* Bd. 22, S. 475
- Ehrlich, P. und Morgenroth, J.** (1904) Wirkung und Entstehung der aktiven Stoffe im Serum nach der Seitenkettentheorie. *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen* 1: 430-451
- Eisenberg, D. und McLachlan, D. A.** (1986) Solvation energy in protein folding and binding. *Nature* 319:199 –203
- Emini, E. A., Hughes, J. V., Perlow, D. S., Bager, I.** (1985) Induction of Hepatitis A virus - neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* 55, 836-839
- Erickson, H. P. und Inglesias, J. L.** (1984) A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature* 311: 267-9
- Erickson, H. P.** (1993) Tenascin C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 869-76
- Engvall, E. und Perlman, P.** (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8: 871-874
- Fearon, E. R., Pardoll, D. M., Itaya, T.** (1990) Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 60: 397–403.
- Fraker, P. J. und Speck, J. C.** (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloro-amide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylpyraline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 849
- Frohman, M.A.** (1993) Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol.* 218:340-56

- Fuss, B., Bartsch, U., Wintergerst, E. S., Pesheva, P., Schachner, M.** (1993) Characterization of the neural recognition molecule janusin (J1-160/180). *Schweiz Arch. Neurol. Psychiatr.* 144: 197-8
- Gates, M. A., Thomas, L.B., Howard, E. M., Laywell, E. D., Sajin, B., Faissner, A., Gotz, B., Silver, J., Steindler, D. A.** (1995) Cell and molecular analysis of the developing and adult mouse subventricular zone of the cerebral hemispheres. *J. Comp. Neurol.* 361: 249-66
- Gildehaus, F. J., Götz, C., Wagner, E., Coporda, M., Hinrichs, M., Schnell, O., Tonn, J. C., Tatsch, K.** (2007) Locoregional radioimmunotherapy of glioma with a Re-188 tenascin antibody: pre-clinical evaluation and first clinical study. 17th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences
- Goding, J. W.** (1996) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.* Academic Press, Academic Press
- Goding, J. W.** (1980) Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Methods* 39:285-308
- Goetz, C. M., Rachinger, W., Decker, M., Gildehaus, F.-J., Stocker, S., Jung, G., Tatsch, K., Tonn, J.-C., Reulen, H.-J.** (2005) Distribution of labelled anti-tenascin antibodies and fragments after injection into intact or partly resected C6-gliomas in rats. *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 337–344
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., Kuby, J.** (2003) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: *Immunology*, 5th ed., pp. 148-150. W. H. Freeman, New York
- Gregor, A., Cull, A.** (1996) Radiotherapy for malignant glioma. *BMJ* 313: 1500-1
- Grodberg, J., Lundigan, M. D., Toledo, D. L., Mangel, W. F., Dunn, J. J.** (1988) Complete nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the ompT gene of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 16:1209
- Grumet, M., Hoffman, S., Crossin, K. L., Edelman, G. M.** (1985) Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *PNAS* 82: 8075-9
- Gulcher, J. R., Nies, D. E., Marton, L. S. und Stefansson, K.** (1989) An alternatively spliced region of the human hexabrachion contains a repeat of potential N-glycosylation sites. *PNAS* 86: 1588–1592.
- Gura, T.** (2002) Therapeutic antibodies: Magic bullets hit the target. *Nature* 417, 584-586
- Hagan, P. L., Halpern, S. E., Dillman, R. O., Shawler, D. L., Johnson, D. E., Chen, A., Krishnan, L., Frincke, J., Bartholomew, R. M., David, G. S., Carlo, D.** (1986) Tumor Size: Effect on Monoclonal Antibody Uptake in Tumor Models. *J. Nucl. Med.* 27: 422-427

- Hagios, C. M., Spring, J., Chiquet, M., Chiquet-Ehrismann, R.** (1996) Tenascin-Y: a protein of novel domain structure is secreted by differentiated fibroblasts of muscle connective tissue. *J. Cell Biol.* 134: 1499-512
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4): 557-80
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for transformation of *E. coli*-DNA-cloning: A practical approach. Glover, D. M. ed. IRL Press Limited, Oxford, England 1: 56-110.
- Hanahan, D., Jesse, J., Bloom, F.R.** (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204: 63-113
- Hanahan D. und Bloom F.R.,** (1996): Mechanism of DNA transformation. En: "Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molekular biology". 2nd Edition. American Society for Microbiology Press. Waschington, D.C. 2449-2459
- Hazra, D. K., Britton, K. E., Lahiri, V. L., Gupta, A. K., Khanna, P., Saran, S.** (1995) Immunotechnological trends in radioimmunotargeting: from 'magic bullet' to 'smart bomb'. *Nucl Med Commun* 16: 66-75
- Heukeshoven, J. und Dernick, R.** (1985) Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung. In: Elektrophorese Forum '86, B.J. Radola, Ed., Technische Universität München, Freising-Weihenstephan
- Heukeshoven, J. und Dernick, R.** (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9: 28-32
- Hindermann, W., Berndt, A., Borsi, L., et al.** (1999) Synthesis and protein distribution of the unspliced large Tenascin C isoform in oralsquamous cell carcinoma. *J. Pathol.* 189: 475-480
- Hoffmann, R., Valencia, A.** (2004) A Gene Network for Navigating the Literature. *Nature Genetics* 36, 664
- Huang, W., Chiquet-Ehrismann, R., Moyano, J. V., Garcia-Pardo, A., Orend, G.** (2001) Interference of Tenascin C with syndecan-4 binding to fibronectin blocks cell adhesion and stimulates tumor cell proliferation. *Cancer Res.* 61: 8586-94
- Huff, J.P., Grant, B.J., Penning, C.A., Sullivan, K.F.** (1990) Optimization of routine transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *Biotechniques* 570-2, 574, 576-7
- Huynh, G. H., Deen, D. F., Szoka, F. C. Jr.** (2006) Barriers to carrier mediated drug and gene delivery to brain tumors. *J. Control Release* 110(2): 236-59

- International Union Against Cancer (UICC)** (1999) Tumor Biology Committee: UICC workshop on the use of dendritic cells in cancer clinical trials. *Cancer* 86: 2674–2683
- Joester, A., Faissner, A.** (2001) The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol.* 20(1): 13-22.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H., Gottesman, K. und Foeller, C.** (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH Publication No. 91-3242, US. Department of Health and Human Services, Bethesda, MD.
- Kennett, R. H., Denis, K. A., Tung, A. S., Klinman, N. R.** (1978) Hybrid plasmacytoma production: Fusions with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81: 77-91
- Kennett, R. H.** (1979) Cell fusion *Methods Enzymol.* 58: 345-59
- Khyse-Andersen, J.** (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10: 203-210.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., Kuby, J.** (2006) *Kuby immunology*. W.H. Freeman Verlag
- Kim, C. H., Bak, K. H., Kim, Y. S., Kim, J. M., Ko, Y., Oh, S. J., Kim, K. M., Hong, E. K.** (2000) Expression of Tenascin C in astrocytic tumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. *Surg. Neurol.* 54: 235-40
- Klein, J.** (1991) *Immunologie*. Wiley-VCH Verlag GmbH
- Knippers, R.** (2006) *Molekulare Genetik*. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart
- Knox, S. J., Goris, M. L., Wessels, B. W.** (1992) Overview of animal studies comparing radioimmuno-therapy with dose equivalent external beam irradiation. *Radiother. Oncol.* 23(2): 111-117
- Köhler, G. und Milstein, C.** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-7
- Koonin, E. V.** (1997) Genome sequences: genome sequence of a model prokaryote. *Curr. Biol.* 7, 656-659.
- Koukoulis, G. K., Gould, V. E., Bhattacharyya, A., Gould, J. E., Howedy, A. A., Virtanen, I.** (1991) Tenascin in normal, reactive, hyperplastic, and neoplastic tissues: biologic and pathologic implications. *Hum. Pathol.* 22: 636-43
- Kruse, J., Keilhauer, G., Faissner, A., Timpl, R., Schachner, M.** (1985) The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 316: 146-8



- Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P.** (2000) Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat. Med.* 6: 332–336.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-9
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (15)227(5259):680-5
- Landis, S. H., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P. A.** (1999) Cancer statistics: CA Cancer. *J. Clin.* 49: 8-31, 1
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., et al.** (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948
- Layne, E.** (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* 3: 447–454.
- Laywell, E. D., Dorries, U., Bartsch, U., Faissner, A., Schachner, M., Steindler, D. A.** (1992) Enhanced expression of the developmentally regulated extracellular matrix molecule tenascin following adult brain injury. *PNAS* 89: 2634-8
- Le Fanu, W. R.** (1973) Edward Jenner. *Proc. R. Soc. Med.* 66(7): 664-8.
- Leins, A., Riva, P., Lindstedt, R., Davidoff, M. S., Mehraein, P., Weis, S.** (2003) Expression of Tenascin C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer* 98: 2430-9
- Lightner, V. A.** (1994) Tenascin: does it play a role in epidermal morphogenesis and homeostasis? *J. Invest. Dermatol.* 102: 273-7
- Loh, E. Y., Elliott, J. F., Cwirla, S., Lanier, L. L., Davis, M. M.** (1989) Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. *Science* 13;243(4888):217-20
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., Kleihues, P.** (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109
- Mackie, E. J., Thesleff, I., Chiquet-Ehrismann, R.** (1987) Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J. Cell Biol.* 105:2569-79
- Mackie, E. J., Chiquet-Ehrismann, R., Adams Pearson, C., Inaguma, Y., Taya, K., Kawarada, Y., Sakakura, T.** (1987) Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *PNAS* 84: 4621-5
- Maldaun, M. V., Suki, D., Lang, F. F., Prabhu, S., Shi, W., Fuller, G. N., Wildrick, D. M., Sawaya, R.** (2004) Cystic glioblastoma multiforme: survival outcomes in 22 cases. *J. Neurosurg.* 100: 61-7

- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.** (1989) Molecular Cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Lit. New York
- Maschler, S., Grunert, S., Danielopol, D., Beug, H., Wirl, G.** (2004) Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF-induced progression of mammary tumor cells. *Oncogene*. 23, 3622–3633
- Meyer, B., Goldbrunner, R., Ringel, F., Dudel, C., Astner, S., Birnbaum, T.** (2007) Hirntumoren und Spinale Tumoren. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München
- Miragall, F., Kadmon, G., Faissner, A., Antonicek, H., Schachner, M.** (1990) Retention of J1/tenascin and the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the adult olfactory bulb. *J. Neurocytol.* 19: 899-914
- Motta-Hennessy, R. M., Sharkey and D.M. Goldenberg** (1990) Metabolism of Indium-111-labeled murine monoclonal antibody in tumor and normal tissue of the athymic mouse, *J. Nucl. Med.* 31: pp. 1510–1519
- Neri, D. und Bicknell, R.** (2005) Tumor Targeting. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 5
- Nossal, G. J. V.** (2003) The double helix and immunology. *Nature* 421: 440-4
- Ohgaki, H. und Kleihues, P.** (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 170: 1445-53
- Overwijk, W. W., Lee, D. S., Surman, D. R.** (1999) Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a „self“ antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *PNAS* 96: 2982–2987
- Öz, B., Karayel, F.A., Gaziodlu, N., Özlen, F., Balci, K.** (2000) The Distribution of ECM Proteins and CD44S Expression in human astrocytomas *Path. Onc. Res.* 6 (2): 118-24
- Paganelli, G., Bartolomei, M., Grana, C., Ferrari, M., Rocca, P., Chinol, M.** (2006) Radioimmuno-therapy of brain tumor. *Neurol. Res.* 28: 518-22
- Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E.** (1984) Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *PNAS* 81: 5985-8
- Plezer, H.** (1981) Pharmakokinetik und Arzneistoffmetabolismus. Steinkopff Verlag, Darmstadt
- Plückthun, A. und Skerra, A.** (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 178: 497-515

- Pöpperl, G., Götz, C., Gildehaus, F. J., Yousry, T. A., Reulen, H. J., Hahn, K., Tatsch, K.** (2002) Initiale Erfahrungen mit der adjuvanten lokoregionalen Radioimmuntherapie mit <sup>131</sup>I-markierten monoklonalen Tenascin-Antikörpern (BC-4) bei Patienten mit Gliom (WHO III und IV). *Nuklearmedizin* 41(3): 120-167
- Pöpperl, G., Götz, C., Rachinger, W., Schnell, O., Gildehaus, F. J., Tonn, J. C., Tatsch, K.** (2006) Serial O-(2-[(<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L: -tyrosine PET for monitoring the effects of intracavitary radioimmunotherapy in patients with malignant glioma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33(7):7 92-800
- Porter, R. R.** (1959) The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies by crystalline papain. *Biochem. J.* 73: 119-27
- Rao, R.D., Uhm, J. H., Krishnan, S., James, C. D.** (2003) Genetic and signaling pathway alterations in glioblastoma: relevance to novel targeted therapies. *Front Biosci.* 1(8): 270-80
- Rathjen, F. G., Wolff, J. M., Chiquet-Ehrismann, R.** (1991) Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecule F11. *Development* 113: 151-64
- Renner, C., Hartmann, F., Pfreundschuh, M.** (2005) The future of monoclonal antibody engineering. *Ann. Hematol.* 80: 127-129
- Retter, I., Althaus, H. H., Münch, R., Müller, W.** (2005) VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res.* 1; 33(Database issue): D671-4.
- Riva, P., Franceschi, G., Riva, N., Casi, M., Santamaria, N., Aamo, M.** (2000) Role of nuclear medicine in the treatment of malignant gliomas: the locoregional radioimmunotherapy approach. *Eur. J. Nucl. Med.* 27: 601-609
- Roux, K. H.** (1995) Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl.* 4: 5185–5194.
- Ruiz, C., Huang, W., Hegi, M. E., Lange, K., Hamou, M. F., Fluri, E., Oakeley, E. J., Chiquet-Ehrismann, R., Orend, G.** (2004) Growth promoting signaling by Tenascin C. *Cancer Res.* 64: 7377-85
- Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T., Aizawa, S.** (1992) Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev.* 6: 1821-31
- Sahin, U., Türeci, Ö., Pfreundschuh, M.** (1997) Serological identification of human tumor antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 709–716:
- Salgaller, M. L., Thurnher, M., Bartsch, G., Boynton, A. L., Murphy, G. P.** (1999) Report from the International Union Against Cancer (UICC) Tumor Biology Committee: UICC workshop on the use of dendritic cells in cancer clinical trials. *Cancer* 86: 2674–2683

- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977) DNA-Sequencing with chain terminating inhibitors. PNAS 74: 5463-5467
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239(4839):487-91
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1992) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology 24:104-8.
- Scharf, S. J., Horn, G. T., Erlich, H. A.** (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. Science 5;233(4768):1076-8
- Schiweck, W., Buxbaum, B., Schätzlein, C., Neiss, H. G., Skerra, A.** (1997). Sequence analysis and bacterial production of the anti-c-myc antibody 9E10: the V(H) domain has an extended CDR-H3 and exhibits unusual solubility. FEBS Lett. 1; 414(1): 33-8
- Schlapsky, M.** (2004) Konstruktion eines bispezifischen F(ab)2-Fragments zur Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms. Dissertation
- Schrimpf, G.** (2002) Gentechnische Methoden. Spektrum Verlag. Heidelberg
- Sernetz, M., Bittner, H. R., Willems, H.** (1986) Organismen als Bioreaktoren: Fraktale Struktur und heterogene Katalyse. Die Umschau 86 582-587
- Sette, A., Buus, S., Appella, E., Smith, J. A., Chesnut, R., Miles, C., Colon, S. M., Grey, H. M.** (1989) Prediction of major histocompatibility complex binding regions of protein antigens by sequence pattern analysis. PNAS 86(9): 3296-300
- Sharkey, R. M. und Goldenberg, D. M.** (2005) Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. J. Nucl. Med. 46:115-127
- Shumann, S.** (1991) Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in E. coli is sequence specific. PNAS 88: 10104-10108
- Shumann, S.** (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase I. j. Biol. Chem. 269, 32678-32684
- Siri, A., Carnemolla, B., Saginati, M., Leprini, A., Casari, G., Baralle, F. and Zardi, L.,** (1991) Human tenascin: primary structure, pre-mRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by two monoclonal antibodies. Nucleic Acids Res. 19, pp. 525–531
- Skerra, A., Pluckthun, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. Science. 240: 1038-41

- Skerra, A.** (1994) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene*. 8;141(1):79-84
- Souriau, C. und Hudson, P. J.** (2003) Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 3(2):305-18.
- Southern, E. M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503
- Sriramarao, P. und Bourdon, M.A.** (1993) A novel tenascin type III repeat is part of a complex of tenascin mRNA alternative splices. *Nucleic Acids Res.* 21: 163–168.
- Storto, G., Buchegger, F., Waibel, R. et al.** (2001) Biokinetics of a F(ab')<sub>3</sub> iodine-131-labeled antigen binding construct (mAk 35) directed against CEA in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm* 16:371-379
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 5;189(1):113-30
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W.** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89
- Swartz, J. R.** (2001) Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 195-201.
- Takeda, A., Otani, Y., Hirooka, E., Okada, K., Torii, T., Shinozuka, N., Koyama, I.** (2007) Plasma large Tenascin C spliced variant as a possible biomarker for the prediction of hepatic recurrence in colorectal cancer. *Surgery*41(1): 124-125
- Tonegawa, S.** (1985) Die Moleküle des Immunsystems. Spektrum der Wissenschaft
- Tortora, G., Gelardi, T., Ciardiello, F., Bianco, R.** (2007) The rationale for the combination of selective EGFR inhibitors with cytotoxic drugs and radiotherapy. *Int. J. Biol. Markers.* 22(1 Suppl 4):47-52
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 76, 4350
- Trefzer, U., Weingart, G., Chen, Y., Herberth, G., Adrian, K., Winter, H., Audring, H., Guo, Y., Sterry, W., Walden, P.** (2000) Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma. *Int. J. Cancer.* 85(5):618-26

- Tsunoda, T., Inada, H., Kalembeiyi. I., Imanaka, K., Sakakibara, M., Okada, R., Katsuta, K., Sakakura, T., Majima, Y., Yoshida, T.** (2003) Involvement of large Tenascin C splice variants in breast cancer progression. *Am. J. Pathol.* 162: 1857-67
- Tucker, R. P., Spring, J., Baumgartner, S., Martin, D., Hagios, C., Poss, P. M., Chiquet-Ehrismann, R.** (1994) Novel tenascin variants with a distinctive pattern of expression in the avian embryo. *Development* 120: 637-47
- Viale, G. L., Castellani, P., Dorcaratto, A., Pau, A., Sehrbundt, E., Siri, A., Birò, A., Zardi, L.** (2002) Occurrence of a glioblastoma-associated Tenascin C isoform in cerebral cavernomas and neighboring vessels. *Neurosurgery* 50(4): 838–842
- Voedisch, B., Menzel, C., Jordan, E., Ghezal, A., Schirrmann, T., Hust, M., Jostock, T.** (2005) Heterologe Expression von rekombinanten Proteinpharmazeutika. *Laborwelt* 6/3
- Vollmer, G.** (1997) Biologic and oncologic implications of Tenascin C/hexabrachion proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 25: 187-210
- Wang, Z., Raifu, M., Howard, M., Smith, L., Hansen, D., Goldsby, R., Ratner, D.** (2000) Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5'exonuclease activity. *J. Immunol. Methods.* 233: 167–177
- Wapnir, I. L., van de Rijn, M., Nowels, K., Amenta, P. S., Walton, K. *et al.*,** (2003) Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *Clin Endocrinol Metab.* 88(4):1880-8.
- Warburg, O. und Christian, W.** (1941) Isolierung und krystallization des garungsferments Enolase. *Biochem. Z.* 310: 384-421
- Weadock, K. S., Sharkey, R. M., Varga, D. C., Goldenberg, D. M.** (1990) Evaluation of a remote radioiodination system for radioimmunotherapy. *J. Nucl. Med.* 31(4): 508-11
- Weber, P., Montag, D., Schachner, M., Bernhardt, R. R.** (1998) Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J. Neurobiol.* 35: 1-16
- Westphal, M.** (1998) Lokale Therapiekonzepte bei malignen Gliomen. *Onkologe* 4: 632–638. Springer-Verlag
- Wheldon, T. E.** (2000) Radiation physics and genetic targeting: new directions for radiotherapy. *Phys. Med. Biol.* 45 R77–R95
- Zalutsky, M. R. und Bigner, D. D.** (1996) Radioimmunotherapy with  $\alpha$ -particle emitting radioimmunoconjugates. *Acta Oncol.* 35: 37-379

- Zalutsky, M. R.** (2005) Current status of therapy of solid tumors: brain tumor therapy. J. Nucl. Med. 46 Suppl. 1:151-6
- Zabriskie, D. W. & Arcuri, E. J.** (1986) Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. Enzyme Microbiol. Technol. 8, 706-717.
- Zagzag, D., Friedlander, D. R., Miller, D. C., Dosik, J., Cangiarella, J., Kostianovsky, M., Cohen, H., Grumet, M., Greco, M. A.** (1995) Tenascin expression in astrocytomas correlates with angiogenesis. Cancer Res. 55: 907-14
- Zemel-Dreassen, O. und Zamir, A.** (1984) Secretion and processing of an immunoglobulin light chain in Escherichia coli. Gene. 7(3): 315-22.
- Zhu, Z., Ghose, T., Kralovec, Y., Yang, C.** (1994) Immunoreactivity, stability, pharmacokinetics and biodistribution of a monoclonal antibody to human leukemic B cells after three different methods of radioiodination. Nucl. Med. Biol. 21,6: 873-882
- Zweit, J.** (1996) Radionuclides and carrier molecules for therapy. Phys. Med. Biol. 41: 1905-1914
- Carter, P.** (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. Nature Reviews Cancer 1, 118-129

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. P. Bartenstein danke ich für die Möglichkeit unter seiner Ägide meine Doktorarbeit anzufertigen.

Ich danke allen meinen lieben Kollegen der Klinik für Nuklearmedizin und der Klinik für Neurochirurgie der LMU zu München für ihre Unterstützung und die vielen netten Gespräche. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau P. D. Dr. med. C. Götz für ihre Hilfestellungen zu Beginn dieser Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Dr. rer. medic. J.-F. Gildehaus für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, für seine kompetente Beratung während der Durchführung der Tierversuche, für die Markierung der Antikörper und „last but not least“ für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Herrn Dr. rer. nat. B. Wängler danke ich ebenfalls für das unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit und für seine Bereitschaft die Ergebnisse dieser Arbeit mit mir kritisch zu diskutieren. Herrn A. Elsner danke ich für die Formatierung dieser Arbeit – ohne seine Vorlagen und seinen vielen Verbesserungsvorschlägen wäre diese Arbeit nicht so schön geworden.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. A. Skerra danke ich für die Möglichkeit unter seiner Anleitung die gentechnische Herstellung des Fab-Fragmentes durchführen zu können. Ebenso danke ich den Mitgliedern am Lehrstuhl für Biologische Chemie für ihre Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Arbeiten.

Meiner allerbesten und allerliebsten Arbeitskollegin und Freundin Sabrina Niedermoser, möchte ich für die unzähligen Gespräche und schönen Abende danken. Danke auch für Dein stets offenes Ohr, denn dank Dir habe ich einige Engpässe während meiner Dissertation überwinden können. Danke auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meiner Familie insbesondere meiner Tochter Analena danke ich für ihr Verständnis, „Dass Mama ihre Doktorarbeit machen muss, und dafür nicht immer Zeit für mich hat!“ und den unzähligen Fragen: „Wann bist Du nun endlich fertig?“, die mich stets angetrieben haben, meine Arbeit nicht schleifen zu lassen. Meinem Mann danke ich insbesondere dafür, dass er die klassische Rollenverteilung als veraltet ansieht und mich immer unterstützt hat und soooo... stolz auf mich ist.

Meinen Eltern danke ich für die vielen Gespräche, die mich insbesondere in der Endphase meiner Dissertation daran erinnert haben, mein Ziel vor Augen nicht zu verlieren.



## 9 Lebenslauf

**Name:** Wagner, Erika  
**Geburtsdatum und -ort:** 2. Januar 1976 in Klein Kopisch

### Schulbildung:

**1982 – 1990** Grundschole  
**1990 – 1992** Realschole  
 Erwerb des Realschulabschlusses  
**1992 – 1996** mathematisch-naturwiss. Gymnasium in München  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Akademische Ausbildung:

**1996 – 2002** Studium der Biologie  
 an der Exzellenzuniversität Konstanz  
*Diplomarbeit: Klonierung der P. tetraurelia Aktin-Gene  
 und Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen  
 Pt Aktin 1*  
 Abschluss des Studiums mit dem Diplom der Biologie,  
 Fachrichtungen: Molekulare Genetik/Entwicklungs- und  
 Zellbiologie

**2005 – 2008** Promotion an der LMU zu München:  
 „Generierung *muriner* monoklonaler Antikörper  
 und gentechnische Herstellung von Fab Fragmenten gegen  
 die tumorassoziierte Isoform 1 des *humanen* Tenascin C  
 für die Radioimmuntherapie von Gliomen“  
 Klinik für Nuklearmedizin (Prof. Bartenstein)  
 Neurochirurgische Klinik (Prof. Tonn)  
 Lehrstuhl für Biologische Chemie (Prof. Skerra)

**2009 – 2010** Wissenschaftliche Angestellte an der Klinik für Nuklear-  
 medizin der LMU (Direktor: Prof. Bartenstein)